# Tyrosinaminotransferase und Tryptophanoxygenase aus Rattenleber: Synthese in vitro und spezifischer m-RNA Gehalt nach Substratinduktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter DONNER

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544720_0028

# Tyrosinaminotransferase und Tryptophanoxygenase aus Rattenleber: Synthese in vitro und spezifischer m-RNA Gehalt nach Substratinduktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter DONNER

1978

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Kröger

Korreferent: Dr. U. Reichert

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 21.12.78

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Tyrosineaminotransferase from rat liver: A purification in three steps. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 771 (1978)

Meiner Mutter

Ein herzliches Dankeschön denjenigen, die mir den Einstieg in die Wissenschaft ermöglichten und das Interesse in mir weckten:

Prof. Dr. E.D. Wachsmuth

H. Leppert

K. Lindau

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Kröger im Robert Koch-Institut in Berlin angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. H. Kröger für die stete Förderung und die guten Arbeitsbedingungen, Herrn Dr. H. Wagner für manchen Rat und für die anregenden Diskussionen.

# Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| | Verzeichnis der Abkürzungen | 9 |
| 1. | EINLEITUNG | 10 |
| 2. | REINIGUNG DER TYROSINAMINOTRANSFERASE | 15 |
| 2.1 | Induktion | 15 |
| 2.2 | Affinitätschromatographie | 17 |
| 2.2.1 | Synthese des Affinitätsgels | 18 |
| 2.2.2 | Durchführung der Affinitätschromatographie | 20 |
| 2.3 | Chromatographie auf Sephadex CM-50 | 22 |
| 2.4 | Chromatographie auf Sephadex G-200 | 23 |
| 2.5 | Weitere Reinigungsschritte | 24 |
| 2.6 | Charakterisierung der gereinigten Tyrosin-aminotransferase | 26 |
| 2.6.1 | Reinheitskriterien | 26 |
| 2.6.2 | Molekulargewichtsbestimmung der TAT-Untereinheit | 27 |
| 2.6.3 | Spezifische Aktivitäten der multiplen Formen der TAT | 28 |
| 2.7 | Herstellung eines Anti-TAT-Serums und dessen Spezifität | 28 |
| 2.8 | Diskussion | 30 |
| 3. | SYNTHESE VON TYROSINAMINOTRANSFERASE UND TRYPTOPHANOXYGENASE IM WEIZENKEIMSYSTEM | 33 |
| 3.1 | Charakterisierung des Systems | 33 |
| 3.1.1 | Zeitabhängigkeit des Gesamteinbaus | 33 |
| 3.1.2 | mRNA-Konzentrationsabhängigkeit des Gesamteinbaus | 35 |
| 3.1.3 | Abhängigkeit des Gesamteinbaus von der Magnesium- und Spermidinkonzentration | 36 |
| 3.1.4 | Leucinabhängigkeit des Gesamteinbaus | 39 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.1.5 | Abhängigkeit der TAT- und TO-Synthese von der Kalium- und Spermidinkonzentration | 40 |
| 3.2 | Identifizierung der mit den Anti-TAT- und Anti-TO-Seren präzipitierten Produkte | 41 |
| 3.3 | Diskussion | 43 |
| 4. | SYNTHESE VON TYROSINAMINOTRANSFERASE UND TRYPTOPHANOXYGENASE IM RETIKULOZYTENSYSTEM | 46 |
| 4.1 | Charakterisierung des Systems | 46 |
| 4.1.1 | Zeitabhängigkeit des Gesamteinbaus | 46 |
| 4.1.2 | Nucleasebehandlung des Lysats | 48 |
| 4.1.3 | mRNA-Konzentrationsabhängigkeit des nuclease-behandelten Systems | 50 |
| 4.1.4 | Leucin-Konzentrationsabhängigkeit des nuclease-behandelten Systems | 50 |
| 4.2 | Synthese von Tyrosinaminotransferase und Tryptophanoxygenase im nucleasebehandelten System | 53 |
| 4.3. | Diskussion | 55 |
| 5. | HÖHERMOLEKULARE TAT-UNTEREINHEIT IN VITRO: WEITERE VERSUCHE ZUR ABKLÄRUNG | 57 |
| 5.1 | Vergleich des Anti-TAT-Serums mit einem fremden Anti-TAT-γ-Globulin | 57 |
| 5.2 | Versuch eines Processings der in vitro synthetisierten TAT-Untereinheit durch Rattenleberhomogenat | 59 |
| 5.3 | Dephosphorylierung der TAT | 61 |
| 5.4 | Cyanbromidspaltung | 62 |
| 5.5 | Diskussion | 65 |
| 6. | TYROSINAMINOTRANSFERASE- UND TRYPTOPHANOXYGENASE-mRNA GEHALT NACH SUBSTRATINDUKTION | 69 |
| 6.1 | Experimentelle Durchführung | 70 |
| 6.2 | Ergebnisse | 74 |
| 6.3 | Diskussion | 78 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 7. | MATERIAL UND METHODEN | 81 |
| 7.1 | Material | 81 |
| 7.2 | Methoden | 82 |
| 7.2.1 | Behandlung und Haltung der Ratten | 82 |
| 7.2.2 | Immunisierung der Kaninchen | 82 |
| 7.2.3 | Erzeugung einer Anämie im Kaninchen | 83 |
| 7.2.4 | Retikulozytenzählung | 83 |
| 7.2.5 | Gewinnung der Antiseren und Isolierung von γ-Globulin aus dem Serum | 83 |
| 7.2.6 | Bestimmung von Protein | 83 |
| 7.2.7 | Aktivitätsbestimmung der Tryptophanoxygenase | 84 |
| 7.2.8 | Aktivitätsbestimmung der Tyrosinaminotransferase | 84 |
| 7.2.9 | TAT-Aktivitätsfärbung im Acrylamidgel | 86 |
| 7.2.10 | Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese nach MILLER et al. | 86 |
| 7.2.11 | Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese nach REISFELD et al. | 87 |
| 7.2.12 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Molekulargewichtsbestimmung nach WEBER und OSBORN | 88 |
| 7.2.13 | Disk-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach LAEMMLI | 89 |
| 7.2.14 | An- und Entfärben der Polyacrylamidgele | 90 |
| 7.2.15 | Radioaktivitätsmessungen | 90 |
| 7.2.16 | Isolierung poly-A-haltiger mRNA aus Rattenleberpolysomen | 91 |
| 7.2.17 | mRNA-Quantifizierung | 92 |
| 7.2.18 | Darstellung eines $^{3}$H-markierten 100.000 g Überstandes aus Rattenleber | 92 |
| 7.2.19 | Bestimmung des Gesamteinbaus und des löslichen Gesamteinbaus im Weizenkeim- und Retikulozytensystem | 93 |
| 7.2.20 | Präzipitation der TAT- und TO-Syntheseprodukte aus dem Weizenkeim- und Retikulozytensystem | 94 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 7.2.21 | Isolierung der Tryptophanoxygenase | 91 |
| 7.2.22 | Autoradiographie und Entwicklung des Röntgenfilms | 94 |
| 8. | ZUSAMMENFASSUNG | 96 |
| 9. | LITERATURVERZEICHNIS | 99 |

## A b k ü r z u n g e n

| | |
|---|---|
| BIS | N,N'-Methylenbisacrylamid |
| cpm | counts per minute |
| DTE | 1,4-Dithioerythrit |
| dpm | disintegrations per minute |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz |
| EGTA | Bis-(aminoäthyl)-glycoläther-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| F.A. | Freund'sches Adjuvans |
| g | Im Zusammenhang mit Zentrifugation: Erdbeschleunigung. Angegeben sind die Zentrifugenröhrchen maximal auftretenden Beschleunigungen. |
| i.c. | intracutan |
| i.m. | intramuskulär |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure |
| OD | Optische Dichte (Extinktion) |
| PMFS | Phenylmethan-sulfonylfluorid |
| rpm | Umdrehung pro Minute |
| SDS | Dodecylsulfat, Natriumsalz |
| TAT | Tyrosinaminotransferase, Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase (EC 2.6.1.5) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TO | Tryptophanoxygenase (EC 1.13.1.12) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit, hier für TAT-Aktivitätseinheit verwendet. |

## 1. EINLEITUNG

Die beiden Leberenzyme Tyrosinaminotransferase (Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase (TAT) EC 2.6.1.5) und Tryptophanoxygenase (Tryptophanpyrrolase (TO) Ec 1.13.1.12) spielen im Aminosäurestoffwechsel eine wichtige Rolle. So desaminiert die TAT das Tyrosin zum p-Hydroxyphenylpyruvat und überträgt die Aminogruppe des Tyrosins auf das α-Ketoglutarat unter Bildung von Glutamat. Primärakzeptor dieser Aminogruppe ist allerdings das Coenzym der TAT, das Pyridoxal-5'-phosphat, erst das entstandene Pyridoxamin-5'-phosphat überträgt seine Aminogruppe auf das α-Ketoglutarat. Die Tryptophanoxygenase öffnet oxydativ den heterozyclischen Ring des Tryptophans zum N-Formyl-Kynurenin.

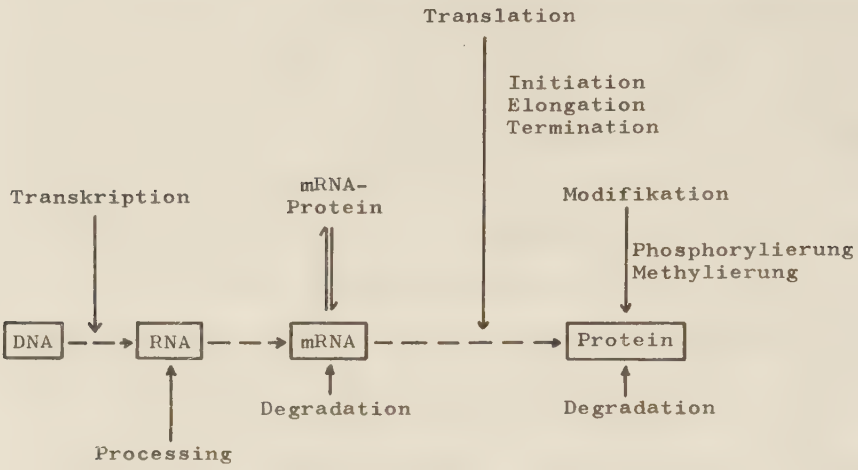
Das interessante an diesen beiden Enzymen ist ihre Induzierbarkeit. Alle nachfolgend zitierten Arbeiten wurden in der Ratte bzw. in Rattenleber ausgeführt. So konnten LIN et al. (1) zeigen, daß in normalen und adrenalektomierten Tieren eine TAT-Aktivitätssteigerung durch Hydrocortison erzielt werden kann. Hier ist zu erwähnen, daß sich durch das Entfernen der Nebennieren der Homrongehalt der Tiere nach ca. 5 Tagen auf ein Minimum herabsenkt. Auch die Tryptophanoxygenaseaktivität kann durch Hydrocortison gesteigert werden (2). Für die TO konnten SCHÜTZ et al. (3) in einem zellfreien Proteinsynthesesystem nachweisen, daß die Aktivitätssteigerung durch das Hydrocortison aus einer Erhöhung der spezifischen TO-mRNA-Konzentration resultiert. Mit dieser Arbeit waren das erste Mal alle Voraussetzungen gegeben, um spezifische mRNA-Konzentrationsveränderungen, wie sie eventuell bei Induktion auf-

treten, nachzuweisen und zu relativieren. In einem zellfreien Proteinbiosynthesesystem wird Gesamt-mRNA bei Anwesenheit radioaktiv markierter Aminosäuren zur Translation gebracht. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wird das gewünschte Produkt aus dem Syntheseansatz präzipitiert und mittels einer Elektrophorese aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert.

Wenig später wiesen ROEWEKAMP et al. (4) nach, daß auch für die TAT die hydrocortisonabhängige Induktion aus einem Anstieg der TAT-mRNA resultiert.

Dibutyryl-cyclisches AMP erhöht den Aktivitätsspiegel der TAT 3 - 6fach in der intakten und adrenalektomierten Ratte, wogegen bei der TO-Aktivität keinerlei Änderung zu beobachten ist (5). Verschiedene Autoren haben nachgewiesen, daß auch hier mit dem Anstieg der TAT-Aktivität eine 5 - 6fache Erhöhung des TAT-mRNA-Spiegels einhergeht (6). Gleichzeitig fanden ROPER et al. (7) eine um den Faktor 5 - 10 erhöhte Elongationsrate für TAT nach Behandlung mit Dibutyryl-cyclischem AMP. Interessant ist hier der Befund, daß sich die Elongationsrate nach Glucocorticoidbehandlung nicht verändert. α-Amanitin, ein spezifischer Inhibitor der RNA-Polymerase II, inhibiert vollständig die cycl. AMP-Induktion (8). So konnte auch durch den Einsatz von Cordicepin nachgewiesen werden, daß im adrenalektomierten Tier die Synthese poly-A-haltiger mRNA für die cycl. AMP-Induktion notwendig ist (9). Diese Beispiele zeigen, daß die Angriffsmöglichkeiten einer Enzymproteinregulation mannigfaltig sein können. In Abb. 1 sind mögliche Regulierungsmechanismen eines Proteins zusammengefaßt.

Abb. 1 Mögliche Angriffsorte (⟶) einer Proteinregulation.




Interessant ist die Substratinduktion beider Enzyme. Frühe Ergebnisse zeigen, daß die TAT nur in Anwesenheit von geringen Dosen Glucocorticoid durch Tyrosin induzierbar ist (10). Im Gegensatz dazu induziert das Tryptophan die TO auch im adrenalektomierten Tier. Hier ist bei gleichzeitiger Gabe von Glucocorticoid und Substrat die Enzymaktivitätssteigerung additiv (2 ). Andere Mechanismen scheinen bei der TAT vorzuliegen, eine gleichzeitige Gabe von Tyrosin und Hydrocortison steigert die TAT-Aktivität synergistisch (10). Aufgabe dieser vorliegenden Arbeit war es, etwas zur Aufklärung dieser Substratinduktionsmechanismen bei TAT und TO beizutragen.

Grundlage der Versuche war die von SCHÜTZ et al. (3) beschriebene Methode. Aus Rattenleberpolysomen isolierte mRNA von Tieren mit unterschiedlichem Induktionsstatus wird in einem zell-

freien Proteinbiosynthesesystem bei Anwesenheit einer radioaktiven Aminosäure zur Translation gebracht. Das System muß zuerst in bezug auf TAT- und TO-Synthese optimiert werden. Mit den isolierten und gereinigten Enzymproteinen werden spezifische Antisera gewonnen, mit deren Hilfe aus dem Syntheseansatz die radioaktiv markierten Produkte, in diesem Falle TAT und TO, präzipitiert und so isoliert werden können. Das Autoradiogramm eines Flachgels des aufgeschlossenen Antigen-Antikörperkomplexes zeigt die Position des Produktes, aus dem Gel kann die Radioaktivität bestimmt werden. Bezieht man die bestimmte Radioaktivität auf eine gemeinsame Größe wie den Gesamteinbau von $^{3}H$ markierter Aminosäure in die neusynthetisierten Proteine, so kann man relativieren und den spezifischen mRNA Gehalt von Tieren mit unterschiedlichem Induktionsstatus miteinander vergleichen.
Mit dieser Methode können Aussagen über das Ansteigen und Abfallen der spezifischen mRNA-Konzentrationen gemacht werden. Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, können mRNA-Konzentrationsänderungen jedoch die verschiedensten Ursachen haben. Gezieltere Aussagen über einen Wirkungsmechanismus können deshalb nur durch Kombination mit einer anderen Methode erzielt werden, erwähnt sei hier nur die Blockade der Transkription durch α-Amanitin.

Zuerst mußten die Voraussetzungen für die Herstellung spezifischer Antiseren geschaffen werden. Die bis zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Reinigungsmethoden der Tyrosinaminotransferase waren zur Herstellung eines notwendig hochreinen Proteins nicht geeignet, es war also erste Aufgabe, eine geeignete

Reinigungsmethode zu finden.

Die Identifizierung des im Weizenkeimsystem gebildeten TAT-Syntheseprodukts bereitete zu Anfang Schwierigkeiten, da das "in vitro" Produkt ein höheres Molekulargewicht als die "in vivo" TAT aufwies. Um dieses Phänomen weiter zu klären, war es notwendig, ein Retikulozytensystem zu etablieren.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich deshalb in drei größere Kapitel: Eine Methode zur Reinigung der Tyrosinaminotransferase, die Synthese der TAT und TO im Weizenkeim- und Retikulozytensystem aus poly-A-haltiger mRNA mit der Identifizierung einer höhermolekular synthetisierten "in vitro" TAT-Untereinheit und die Untersuchungen über die TAT- und TO-mRNA-Konzentrationen bei der Substratinduktion beider Enzyme.

## 2. REINIGUNG DER TYROSIN-AMINOTRANSFERASE

Zur Gewinnung eines spezifischen Antikörpers gegen TAT war eine größere Menge reinen Enzyms notwendig. Bisher beschriebene Reinigungsmethoden ergaben kein sauberes Enzymprotein oder waren wegen der Vielfalt der Reinigungsschritte langwierig und umständlich (12, 13). Mit Hilfe der Affinitätschromatographie und zwei weiteren Reinigungsschritten, der CM-50 Sephadex-Chromatographie und der G-200 Gelfiltration konnte das Enzym einfach und schnell dargestellt werden. Eine typische Reinigungsprozedur ist in einem Schema in Tab. I zusammengefaßt.

### 2.1 Induktion

Eine optimale Enzymanreicherung setzt eine hohe Enzymkonzentration voraus. STILES et al. (14) konnten zeigen, daß Cycloheximid die Degradation von TAT-mRNA hemmt. HOFER et al. (15) wiesen nach, daß Cycloheximid 2 Stunden nach Hydrocortisoninduktion den Gehalt an translationierbarer TAT mRNA verfünffacht. Weiterhin ist bekannt, daß Tyrosin oder Tryptophan in Verbindung mit Hydrocortison die Tyrosinaminotransferase zusätzlich stimulieren (1, 10). Um eine hohe Enzyminduktion zu erhalten, wurden deshalb intakte Ratten nach folgendem Schema behandelt:

| Stunden | i.p. Injektion mit: |
|---|---|
| 0 | 100 mg Hydrocortisonacetat, 500 mg L-Tryptophan, 350 µg Cycloheximid/20 ml 1 % Gummi Arabicum/kg Lebendgewicht |
| 16 | 100 mg Hydrocortisonacetat, 250 mg L-Tryptophan/ 20 ml 1 % Gummi Arabicum/kg Lebendgewicht |
| 19 | wie 16 Stunden |
| 25 | Tiere wurden getötet und die Lebern entnommen. |

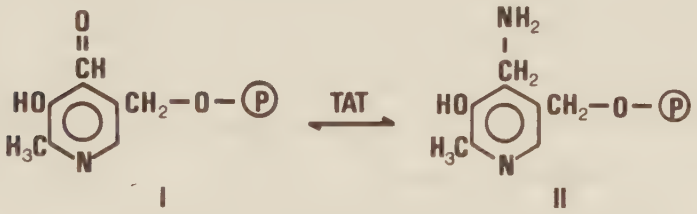
| Reinigungsschritt | Volumen (ml) | Total Protein (mg) | Total Aktivität (U) | Spezifische Aktivität (U/mg) | Ausbeute % | Anreicherung n-fach |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 100.000 g Überstand | 555 | 22 200 | 7112 | 0,32 | 100 | - |
| Affinitäts-chromatographie | 60 | 63 | 5202 | 83 | 73 | 258 |
| CM-50 Chromatographie | 222 | 7,3 | 2900 | 396 | 41 | 1238 |
| G-200 Filtration | 17 | 2,9 | 1900 | 655 | 27 | 2047 |

Tab. I Reinigung der Tyrosinaminotransferase aus Rattenleber.
Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Prozeduren bei 4° C durchgeführt.

Mit dieser Behandlung kann die TAT-Aktivität in der Rattenleber vom Basalwert mit 0,005 - 0,02 U/mg Protein auf 0,30 - 0,40 U/mg Protein angehoben werden. Das entspricht einer dreißigfachen Induktion.

## 2.2 Affinitätschromatographie

Die Idee, aus dem Coenzym der TAT (Abb. 2) ein Affinitätsgel zu synthetisieren, wurde erstmals von MILLER et al. (16) verwirklicht. Aus synthesechemischen Gründen entschieden sie sich für das Pyridoxamin-5'-phosphat (II), der Form des Coenzyms, welche die Aminogruppe des Tyrosins übernommen hat und dem α-Ketoglutarat weiter überträgt.




I II

Abb. 2 Die beiden Formen des Coenzyms der Tyrosinaminotransferase: Pyridoxal-5'-phosphat (I) und Pyridoxamin-5'-phosphat (II).

Durch das Vorhandensein einer Aminogruppe im Pyridoxamin-5'-phospat bietet sich als Bindungsmöglichkeit zwischen Gel und Coenzym die Synthese einer Peptidbindung an, obwohl die Bindung des Pyridoxamin-5'-phosphats an das Apoenzym mit einem Km von $10^{-7}$ $M^{-1}$ (45) im Gegensatz zum Pyridoxal-5'-phosphat (I) mit einem Km von $10^{-8}$ $M^{-1}$ (45) zehnmal geringer ist.

## 2.2.1 Synthese des Affinitätsgels

Ausgangsmaterial für die in Abb. 3 dargestellte Synthese war die AH-Sepharose 4 B, eine Sepharosematrix mit einem Aminohexylrest (III). Diese bereits vorhandene Spacergruppe konnte durch Kondensation mit Bernsteinsäureanhydryd verlängert werden (IV). Das Pyridoxamin-5'-phosphat wurde mit der freien Carboxylgruppe der Succinylaminohexylsepharose verknüpft (V).

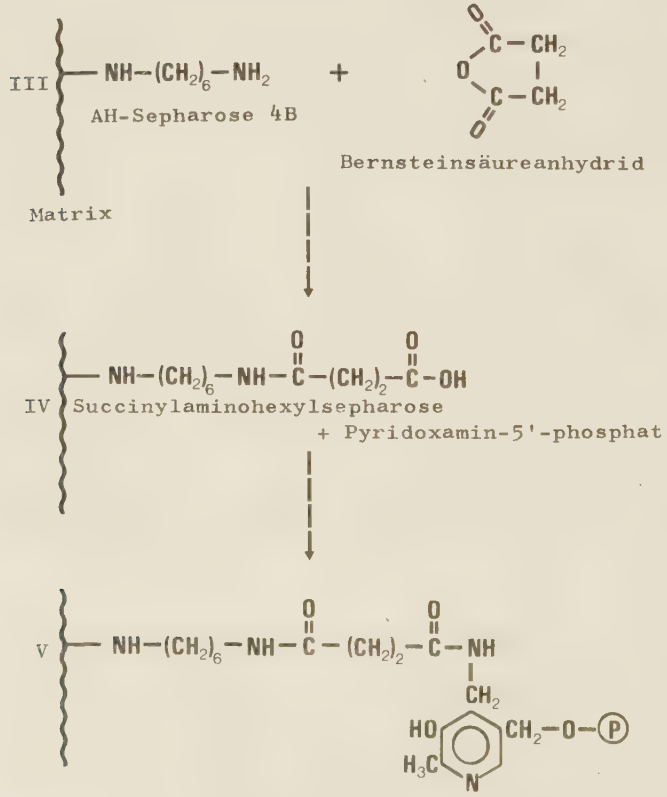



Abb. 3 Synthese-Schema des Affinitätsgels.

15 g AH-Sepharose 4 B wurden in 200 ml 0,5 M NaCl gequollen und anschließend bei 4° C mit 3 l NaCl 0,5 M in Portionen zu 100 ml über einer G 3 Glasfritte gewaschen. Mit ca. 2 l dest. $H_2O$ wurden Chloridionen aus dem Gel entfernt und in 50 ml dest. $H_2O$ mit 5,5 g Bernsteinsäureanhydrid suspendiert, mit 20 % NaOH auf pH 6,0 eingestellt und 25 Stunden bei diesem pH-Wert im Kühlraum (4° C) gehalten. Die so gewonnene Succinyl-aminohexylsepharose wurde mit 500 ml eiskaltem Wasser von der überschüssigen Bernsteinsäure befreit, wieder in 50 ml dest. $H_2O$ suspendiert, mit 300 mg Pyridoxamin-5'-phosphat-hydrochlorid versetzt und eine Lösung von 2,7 g N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid in 8 ml dest. $H_2O$ schnell dazugegeben. Bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch gerührt und mit 1 N NaOH bei pH 4,7 gehalten. Nach einer Stunde wurde ein weiteres Gramm Carbodiimid zugegeben. Fünf Stunden danach füllte man das Gel in eine 4° C gekühlte Pharmaciasäule (2,6 cm Ø) und wusch in Portionen a 100 ml mit 10 l NaCl-Lösung 0,1 N über 10 Stunden hinweg. Das so synthetisierte Affinitätsgel wurde mit 50 ml 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6), 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 % Rinderserumalbumin beladen und danach wie üblich regeneriert.

Dazu wurde nach dem Affinitätslauf das Gel in der Säule in 300 ml 0,1 NaOH aufgerührt, dann mit 1 l dest. $H_2O$ gewaschen und mit Tris-Puffer äquilibriert. Die ganze Prozedur wurde bei 4° C durchgeführt und das Gel bei dieser Temperatur aufbewahrt.

### 2.2.2 Durchführung der Affinitätschromatographie

Die kleingeschnittenen Lebern von 25 - 30 intakten, induzierten Ratten wurden in der Kälte eine Minute lang in einer Lösung aus 0,1 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF in einem Endvolumen von 390 ml mit dem Ultra Turrax homogenisiert. PMSF wurde wegen seiner Unstabilität in Wasser erst kurz vor Versuchsbeginn zur Lösung zugegeben. Nach der Zentrifugation (60 min, 35.000 g, Beckman Rotor 35) unterwarf man das Sediment der gleichen Prozedur und konnte so die Gesamtenzymaktivität im "100.000 g Überstand" um 10 - 20 % erhöhen.

Die vereinigten Überstände ließ man über Nacht bei $4^{o}$ C durch das Affinitätsgel (2,6 x 12 cm) mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 500 µl/min laufen. Nachdem das Gel mit 500 ml 50 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ (pH 7,6) in Portionen gewaschen war (der Durchlauf war nicht länger trübe und das Gel wieder weiß), wurde das Enzym mit 200 ml 50 mM Tris, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 30 mM ß-Mercaptoäthanol, 500 mM NaCl, 10 mM Pyridoxal-5'-phosphat, 150 mM Saccharose, 3 mM Spermin (pH 10) mit der selben Durchlaufgeschwindigkeit eluiert; ein typisches Eluierungsdiagramm ist in Abb. 4 wiedergegeben.

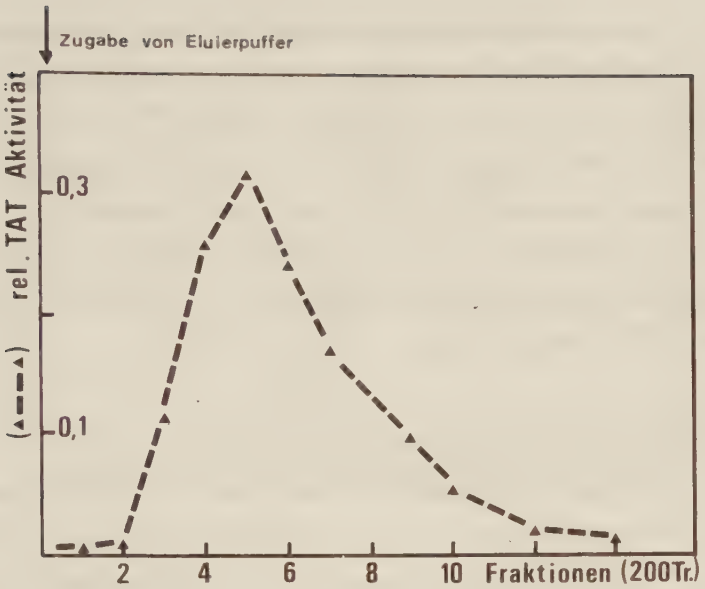



Abb. 4 Eluierungsprofil der TAT aus dem Affinitätsgel. Wegen des hohen Pyridoxal-5'-phosphatgehalts im Eluierungspuffer konnte keine Proteinkurve bei OD 280 aufgenommen werden, da das Coenzym bei dieser Wellenlänge ebenfalls absorbiert.

Der extrem hohe pH-Wert von 10 und die Anwesenheit von Spermin machten eine Ablösung der gefundenen TAT erst möglich. Von 7112 Enzymeinheiten (100 %), welche über die Säule gegeben wurden, erscheinen 1214 U im Durchlauf und in der Waschlösung. Davon waren 5898 U (83 %) am Affinitätsgel gebunden worden. Es konnten 5200 U (73 %) eluiert werden. Die Gesamtausbeute dieses Reinigungsschrittes betrug 60 - 80 %.

Das Eluat (ca. 150 - 200 ml) wurde mittels Druckdialyse über eine Membran mit einem Ausschlußmolekulargewicht von 50.000 Daltons auf 40 - 60 ml konzentriert. Von 5898 U konnten 14 U

(0,2 %) die Membran passieren. Da als nächster Reinigungsschritt eine Ionenaustausch-Chromatographie folgte, machten die hohe Salzkonzentration, der hohe pH-Wert von 9,0 und die Anwesenheit des Polyamins Spermin eine Dialyse notwendig. Das Präparat dialysierte 2 Tage lang gegen insgesamt 10 l Natriumphosphatpuffer 50 mM, 1 mM EDTA, 1 mM ß-Mercaptoäthanol, 2,5 mM α-Ketoglutarat (pH 6,5). Während der Dialyse ging keine Enzymaktivität verloren.

## 2.3 Chromatographie auf Sephadex CM-50

Die dialysierte Enzympräparation wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 450 µl/min an den zuvor mit Dialysepuffer äquilibrierten Ionenaustauscher (1,6 x 25 cm) gebunden und auch mit diesem Puffer so lange gewaschen, bis der Monitor bei 280 nm keine Absorption mehr zeigte. Beim Eluieren mit einem linearen Gradienten (500 ml) von 0 - 0,4 M KCl in Dialysepuffer (Abb. 5) trat die TAT in 3 - 4 multiplen Formen auf, wie sie auch schon JOHNSON et al. (17) beobachtete. Um die Umwandlung der Form III in II und I, wie sie in vivo auftritt, weitgehend zu verhindern, wurde am Reinigungsanfang 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid zugesetzt (18). Fraktionen mit TAT-Aktivität und geringem Proteinanteil wurden vereinigt und durch Druckdialyse auf 1 - 2 ml eingeengt. Von 5200 aufgegebenen Units wurden 4.109 (75 %) gebunden, davon konnten 3684 U (71 %) eluiert werden. Da jedoch einige Fraktionen der multiplen Form IV und Teile von III wegen ihres hohen Fremdproteinanteils nicht gepoolt werden konnten, verlor man in diesem Schritt 500 - 1000 Units.

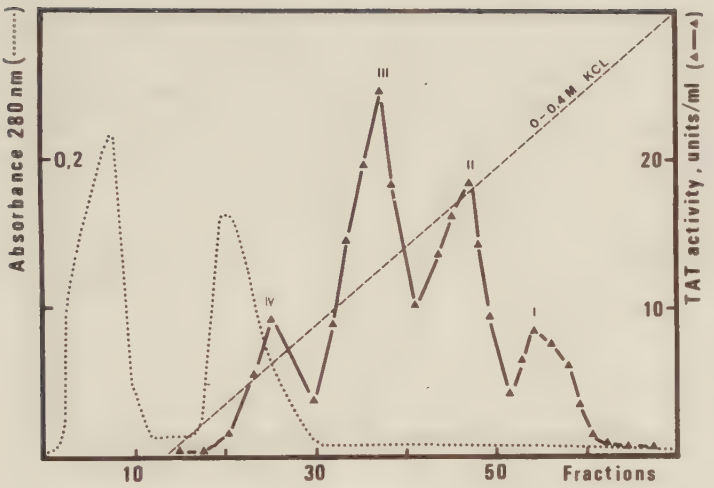



Abb. 5 CM-50 Ionenaustauschchromatographie der TAT. Das Gel (2,6 x 25 cm) wurde mit Dialysepuffer äquilibriert und die Chromatographie bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 0,45 ml/min durchgeführt. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 500 ml (0 - 0,4 M KCl in Dialysepuffer), in 10 ml Portionen fraktioniert.

## 2.4. Chromatographie auf Sephadex G-200

Die konzentrierte Enzymlösung wurde mit einer Durchflußrate von 200 µl/min einer Sephadex G-200 Gelchromatographie in Dialysepuffer unterworfen. Bei einem gepackten Gel von 1,6 x 80 cm erschien das Enzym mit 70%iger Ausbeute in einem einzelnen Aktivitätspeak (Abb. 6). Die spezifische Aktivität war in jedem Punkt des Peaks gleich hoch und betrug 600 - 700 U/mg. Das durch Druckdialyse auf 0,3 - 0,5 mg/ml konzentrierte Enzym wurde in Dialysepuffer bei -20° C gelagert.
Mit dieser letzten Reinigungsstufe lag eine homogene Enzympräparation vor.

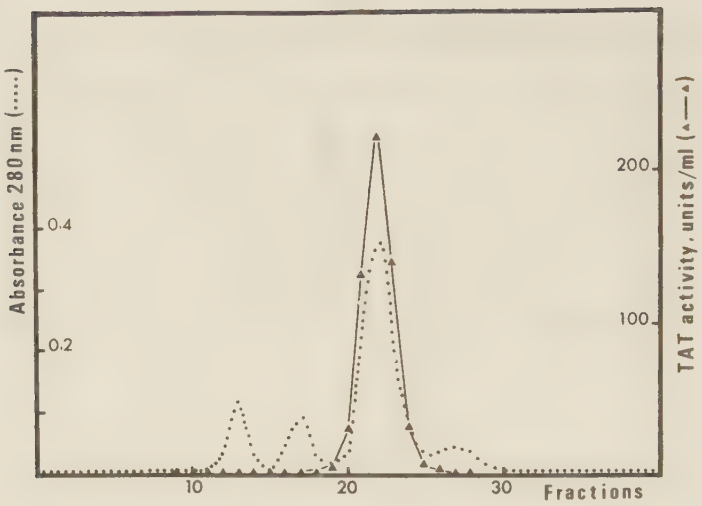



Abb. 6 Die Gelfiltration über Sephadex G-200.
Sie wurde bei einer Durchflußrate von 0,2 ml/min in Dialysepuffer durchgeführt und Fraktionen von 50 Tropfen aufgefangen.

## 2.5. Weitere Reinigungsschritte

Wie später diskutiert wird, fanden andere Autoren eine doppelt so hohe spezifische Aktivität (12, 13). Deshalb sollten zusätzliche Reinigungsschritte zeigen, ob das gereinigte Enzym aus der Sephadex G-200 Chromatographie noch weiter anzureichern ist. Abb. 7 zeigt einen Lauf von gereinigter TAT nach der G-200 Chromatographie in einem 5 - 20%igen Saccharosegradienten in Dialysepuffer. Die spezifische Aktivität der TAT war nach dem Lauf die gleiche.

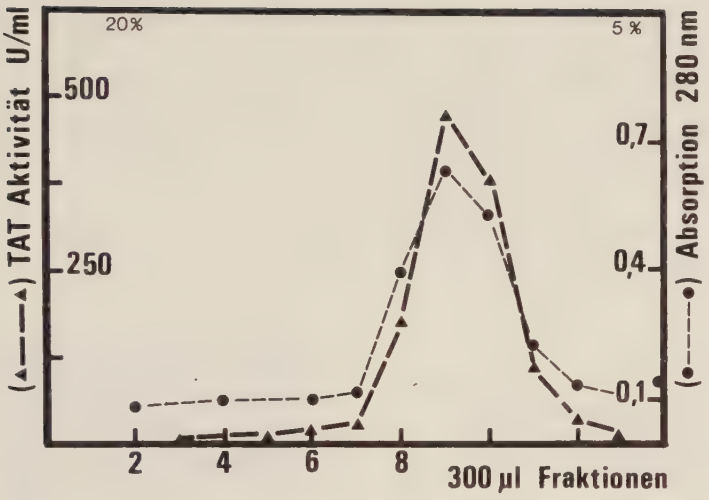



Abb. 7 Saccharosegradient (5 - 20 %) einer gereinigten TAT Präparation nach dem G-200-Schritt.
Zentrifugation im Beckman-Rotor SW 65 Ti bei 40000 rpm 10 Stunden.

Eine mit DEAE-Sepharose CL-4B durchgeführte Chromatographie mit einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer, 0,5 mM α-Ketoglutarat, 0,1 mM Pyridoxal-5'-phosphat, 1 mM DTE (pH 7,6) und einem linearen KCl Gradienten von 0 - 0,4 M in diesem Puffer ergab keine weitere Anreicherung. Im Gegensatz zum CM-50 Ionenaustauscher erscheint hier das Enzym in einem Peak.

## 2.6 Charakterisierung der gereinigten Tyrosinaminotransferase

### 2.6.1 Reinheitskriterien

Die gereinigte TAT zeigte nach der Harnstoffacrylamid-Gelelektrophorese nach REISFELD et al. (19) und nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach WEBER et al. (20) eine Proteinbande (Abb. 8).

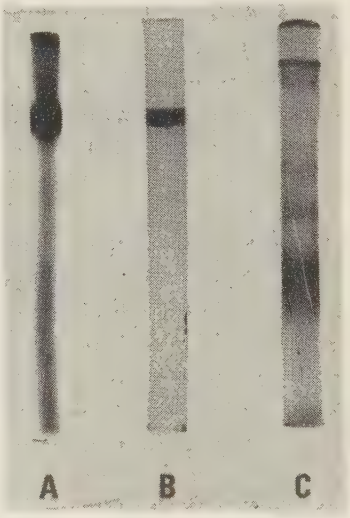



Abb. 8

A) Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach REISFELD et al. (19).

B) SDS-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (20).

C) Disk-Elektrohorese nach MILLER et al. (16). TAT-Aktivitätsfärbung nach VALERIOTE et al. (32).

Proben von 40 µg (A, B) und 1 µg (C) wurden aufgetragen.

Nach einer Aktivitätsfärbung der TAT im Disk-Polyacrylamidgel nach MILLER et al. (16) konnten 3 Enzymbanden lokalisiert werden. Diese drei Banden entsprechen den drei multiplen Formen wie sie bei der CM-50 Chromatographie auftreten (22).

## 2.6.2 Molekulargewichtsbestimmung der TAT-Untereinheit

Nach der Methode von WEBER und OSBORN (20) wurde das Molekulargewicht der TAT-Untereinheit mit 50.000 Daltons bestimmt (Abb. 9).

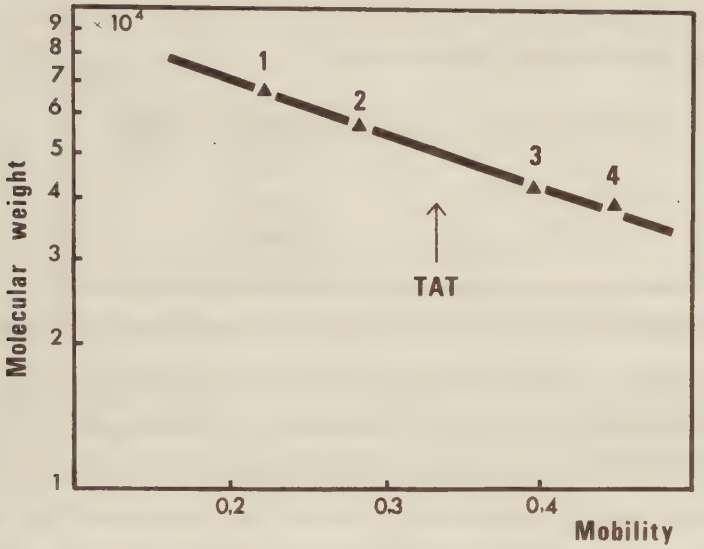



Abb. 9 Molekulargewichtsbestimmung der TAT-Untereinheit nach WEBER und OSBORN (20).
Folgende Proteine wurden verwendet: (1) Rinderserumalbumin (68.000); (2) Pyruvatkinase (57.000) vom Kaninchen; (3) TO (43.000) von der Ratte; (4) Aldolase (38.500) vom Kaninchen.

Die Untereinheit der TAT läuft deshalb mit der schweren Kette des γ-Globulins vom Kaninchen und ist aus diesem Grund bei Auftrennung im SDS-Gel eines Anti-TAT:TAT-Präzipitats als Proteinbande schwer nachzuweisen.

### 2.6.3 Spezifische Aktivität der multiplen Formen

Gereinigtes Enzym wurde erneut mit Hilfe der CM-50 Chromatographie in die drei multiplen Formen aufgetrennt, die Form IV war nicht sichtbar, weil sie ja während der Reinigung abgetrennt wird. Vergleicht man die aus den drei Gipfelfraktionen ermittelten spezifischen Aktivitäten, so läßt sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

| Multiple Form | spez. Aktivität (U/mg) |
|---|---|
| I | 593 |
| II | 563 |
| III | 590. |

### 2.7 Herstellung eines Anti-TAT-Serums und dessen Spezifität

Das gewonnene reine Enzym wurde zur Herstellung des Anti-TAT-Serums verwendet. Dazu wurde das Enzym in Verbindung mit Freund'schem Adjuvans nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren in das Kaninchen injiziert. Um zu prüfen, ob das so gewonnene Serum TAT-spezifisch ist, wurde die TAT-Aktivitätshemmung des Antiserums ermittelt. Dies war ein erster Versuch, zu zeigen, daß das Serum Anti-TAT-γ-Globulin enthält.

Der Versuch in Abb. 10 zeigt, daß 2 µl Antiserum TAT-Aktivitäten bis zu 0,4 OD 334 nm 100%ig hemmen können. Berechnet man aus der ermittelten TAT-Aktivität die Enzymmenge, so inaktivieren 2 µl Antiserum 3 µg TAT. Erhöht man die TAT-Konzentration bei gleichbleibender Antiserumkonzentration, so ist die Hemmung entsprechend geringer, da offensichtlich nicht mehr

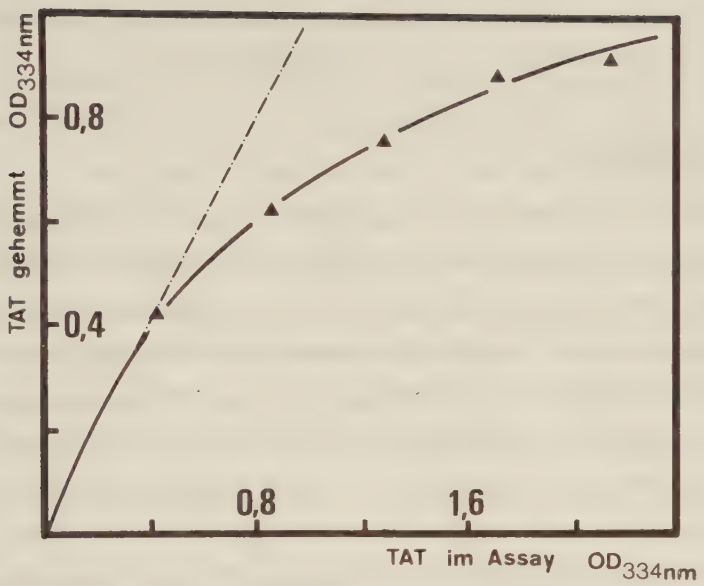



Abb. 10 Hemmung der TAT durch Antiserum (2 µl).
Die verlängerte Linie (-·-·-) markiert eine 100%ige Hemmung.
Test bei TAT-Aktivitätsbestimmungs-Bedingungen durchgeführt.
Enzym und Antiserum vor Testbeginn 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. TAT-Aktivität in $OD_{334}$ angegeben.

alle aktiven Enzymzentren besetzt werden können. Im Vergleich dazu zeigt das Serum eines nicht immunisierten Kaninchens keine Hemmung, selbst wenn man die fünffache Menge Serum gibt:

| Assay | Aktivität OD 334 nm |
|---|---|
| normales Enzymassay | 0,430 |
| normales Enzymassay + 2 µl Antiserum | 0,010 |
| normales Enzymassay + 10 µl Serum eines nicht immunisierten Kaninchens | 0,416 |

Die Äquivalenzpunktbestimmung des Antiserums wurde nach der Arbeit von SCHÜTZ et al. (3) durchgeführt.

## 2.8 Diskussion

MILLER et al. (16) konnten zeigen, daß bei einer direkten Bindung des Coenzyms an die Gelmatrix die Bindung von Apoenzym an das Affinitätsgel gering ist. Durch Vergrößerung des Abstandes zwischen Matrix und Coenzym durch Einfügen von Spacergruppen erhöht sich die Affinität um ein Vielfaches. Aufgrund dieser Ergebnisse ging man bei der Synthese des Affinitätsgels von einer Sepharosematrix aus, welche bereits einen Aminohexylgruppenrest besaß (Abb. 3 III). Durch Verlängerung der Spacergruppe mit Bernsteinsäureanhydrid konnte gleichzeitig die zur Peptidknüpfung des Pyridoxamin-5'-phosphats notwendige freie Carboxylgruppe geschaffen werden. Da weder die synthetisierte Succinylaminohexylsepharose (Abb. 3 IV) noch das Pyridoxamin-5'-phosphat weitere Carboxyl- und Aminogruppen aufweisen, war die Knüpfung dieser spezifischen Peptidbindung problemlos.

Die hohe Anreicherung der TAT aus dem 100.000 g Leberüberstand (200 - 300fach) macht die Affinitäts-Chromatographie zum effektivsten Reinigungsschritt in der beschriebenen Reinigungsprozedur. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die TAT den für ein Enzym extremen pH-Wert von 9 - 10 über Stunden ohne bemerkenswerten Schaden übersteht. Wie gezeigt werden konnte, macht die hohe Affinität des Pyridoxamin-5'-phosphats zum Apoenzym mit $10^{-7}$ $M^{-1}$ diese Erhöhung des pH-Wertes notwendig. Die Rolle

des Spermins beim Ablösevorgang bleibt ungeklärt.

Im Eluierungsprofil der CM-50-Chromatographie treten die von JOHNSON et al. (17) beschriebenen multiplen Formen der TAT (Form I bis III) auf. Oftmals kann eine weitere vierte Form (IV) beobachtet werden, wie sie auch RODRIGUES et al. (23) fanden. Um die Umwandlung von Form III in die Form II und I im Homogenat zu verhindern, wurden die Rattenlebern mit Phenylmethylsulfonylfluorid homogenisiert (18). Diese Verbindung ist in wäßrigen Lösungen sehr unstabil (24) und wurde daher erst kurz vor Versuchsbeginn zugesetzt. Die bei der Reinigung wegen zu hohen Fremdproteingehalts verworfene Form IV ist in der sauberen Enzympräparation, die aus den Formen I, II und III besteht, nicht enthalten. Da ROEWEKAMP et al. (13) jedoch nachgewiesen hatten, daß zumindest zwei der multiplen Formen immunologisch kreuzreagent sind, kann die hier beschriebene Enzympräparation ohne Bedenken zur Anti-TAT-Antikörperherstellung verwendet werden.

Der G-200 Gelfiltrationsschritt ist der Reinigungsschritt mit dem größten Enzymaktivitätsverlust. Andere Reinigungsmethoden (13, 12) beschreiben wesentlich höhere spezifische Aktivitäten von 1200 - 1400 U/mg. Würde man den Aktivitätsverlust im hier beschriebenen Gelfiltrationsschritt mit 30 % Enzyminaktivierung in Rechnung stellen, so käme man günstigenfalls auf eine spezifische Aktivität von 910 U/mg. Da das gereinigte Enzym in erster Linie für die Antikörperherstellung Verwendung finden sollte, kam es vordringlich auf die Reinheit des Präparates an. Das gereinigte Enzymprotein zeigt in verschiedenen Elektropho-

resen nur eine Bande. Wie später noch gezeigt werden soll, präzipitiert das Serum eines mit diesem Enzym immunisierten Kaninchens nur ein Protein aus einem 100.000 g Rattenleberüberstand.

Das Molekulargewicht der TAT-Untereinheit wurde mit 50.000 Daltons bestimmt. Dieser Wert zeigt gute Übereinstimmung mit den Daten von LEE et al. (25) und BELARBI et al. (12), die die Untereinheit mit 50.000 bzw. 52.000 Daltons bestimmten. Interessant ist die Tatsache, daß Molekulargewichtsbestimmungen, welche mit relativ unsauberem Enzym durchgeführt wurden, im Wert wesentlich niedriger liegen: AURICHIO et al. (26) mit 32.000 und DIAMONDSTONE et al. (27) mit 23.000.

# 3. SYNTHESE VON TYROSINAMINOTRANSFERASE UND TRYPTOPHANOXYGENASE IM WEIZENKEIMSYSTEM

Zur Abklärung der Frage, inwieweit Induktionsvorgänge in der Rattenleber mit einer Regulierung der Transkription im Zusammenhang stehen, wurde nach einem System gesucht, in dem die TAT oder TO in Anwesenheit von $^{3}$H-Aminosäuren aus Gesamt-mRNA synthetisiert und die radioaktiven Produkte mittels spezifischer Antiseren präzipitiert werden konnten. So wäre dann ein relatives Vergleichen der mRNA-Konzentration bei verschiedenen Induktionszuständen möglich.

## 3.1. Charakterisierung des Systems

Der klassische 30.000 g-Weizenkeimüberstand wurde nach der Methode von ROBERTS und PATERSON (21) hergestellt und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert. Vor Ermittlung der spezifischen Synthesebedingungen für TAT und TO wurde der Gesamteinbau des Systems optimiert.

### 3.1.1 Zeitabhängigkeit des Gesamteinbaus

Mit Hilfe des Einbaus von $^{3}$H-Leucin in die im System synthetisierten Proteine kann die Syntheseaktivität des Weizenkeimsystems bestimmt werden.
Zur Translation wurde das Weizenkeimsystem mit folgendem Energiesystem angereichert:

Energiesystem: 20 mM ATP
400 µM GTP
160 mM Kreatinphosphat
200 mM Hepes

alles mit 1 M KOH auf pH 7,5 stellen und die benötigte $K^+$-Menge später berücksichtigen.

Dieses Energiesystem wird mit 8 mg Kreatinphosphokinase/10 ml angereichert.

Der generelle 50 µl-Syntheseansatz wurde wie folgt zusammengestellt:

| | | |
|---|---|---|
| 20,0 µl | Weizenkeimsystem | |
| 2,5 µl | Energiesystem | |
| 0,5 µl | L-Aminosäuren (5 mM, ohne Leucin) | 0° C |
| 0,5 µl | DT (200 mM) | |
| 23,5 µl | | |
| 26,5 µl | Volumen für mRNA, $Mg^{++}$, $K^+$, Spermidin, $^3$H-Leucin und $H_2O$ | |
| 50,0 µl | System | |

Dieser generelle Syntheseansatz fand für alle folgenden Versuche Anwendung.

Abb. 11 zeigt den Gesamteinbau von $^3$H-Leucin im Weizenkeimsystem mit und ohne Zusatz exogener mRNA. Gesamteinbau bedeutet hier der Einbau von $^3$H-Leucin in lösliche Proteine und in die nascenten Ketten an den Polysomen.
Während der ersten 30 min ist der Einbau nahezu linear. Das System ist durch Zugabe von poly-A-haltiger mRNA sehr hoch stimulierbar, doch auch mit endogener mRNA zeigt das System nach 90 min keinen weiteren Einbau. Alle weiteren Versuche wurden 60 min lang bei 30° C inkubiert.

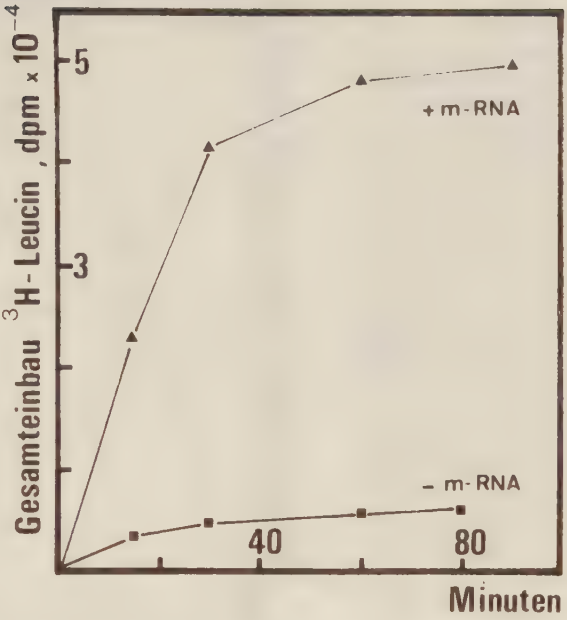
Abb. 11

Zeitabhängigkeit des $^3$H-Leucin-Gesamteinbaus mit und ohne exogene mRNA.

Einbau in 10 µl System bestimmt.

Synthesebedingungen: 0,4 mM Spermidin, 86 mM $K^+$ und 2 mM $Mg^{++}$. mRNA-Konzentration: 80 µg/ml.

Systemansatz siehe 3.1.1.

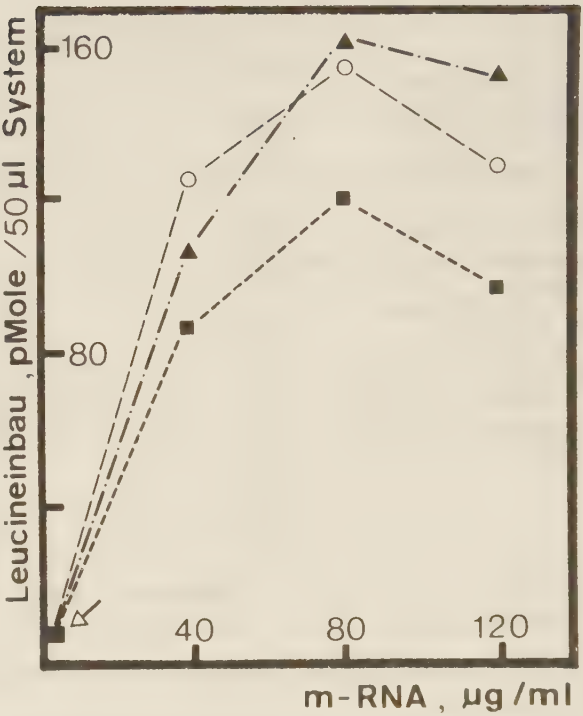



### 3.1.2 mRNA-Konzentrationsabhängigkeit des Gesamteinbaus

Das durch exogene mRNA gut stimulierbare Weizenkeimsystem ist mRNA-konzentrationsabhängig. Poly-A-haltige mRNA aus verschiedenen Rattenlebern, die aus Polysomen und mit Hilfe der oligo-dT-Chromatographie (siehe Methodenteil) gewonnen wurde, zeigt jeweils das gleiche Leucineinbaumaximum (Abb. 12).
Das Einbaumaximum liegt jeweils bei 80 µg mRNA/ml Systemansatz. Bezieht man den ermittelten exogenen Gesamteinbau von 100 - 160 p Molen Leucin/50 µl Ansatz auf den endogenen Einbau des Systems, so kann das Weizenkeimsystem durch Zugabe von poly-A-haltiger mRNA aus Rattenleber im Konzentrationsoptimum 14 - 23fach gesteigert werden. Das geht auch aus den Abb. 11 dargestellten Ergebnissen hervor.

Abb. 12

mRNA-konzentrationsabhängiger Gesamtleucineinbau.
3 mRNA-Präparationen aus verschiedenen Rattenlebern wurden getestet.
Der Pfeil markiert den endogenen Gesamteinbau. Gesamteinbaubestimmung siehe Methodenteil.
Der Versuch wurde bei optimalen Bedingungen durchgeführt: 2 mM $Mg^{++}$, 87 mM $K^{+}$ und 0,4 mM Spermidin.
(Systemansatz siehe 3.1.1)




3.1.3 Abhängigkeit des Gesamteinbaus von der Magnesium- und Spermidinkonzentration

ATKINS et al. (28) wiesen nach, daß Polyamine wie Spermidin, Spermin und Putrescin den Aminosäureeinbau in "in vitro"-Systeme begünstigen. Ein erster Versuch sollte zeigen, welches der Polyamine im Weizenkeimsystem den Gesamteinbau optimal stimuliert (Abb. 13).
Spermin und Spermidin stimulieren besser als Putrescin; da Spermin in sehr engen Konzentrationsgrenzen stimuliert, wurden weitere Versuche mit Spermidin durchgeführt. Da die Pro-

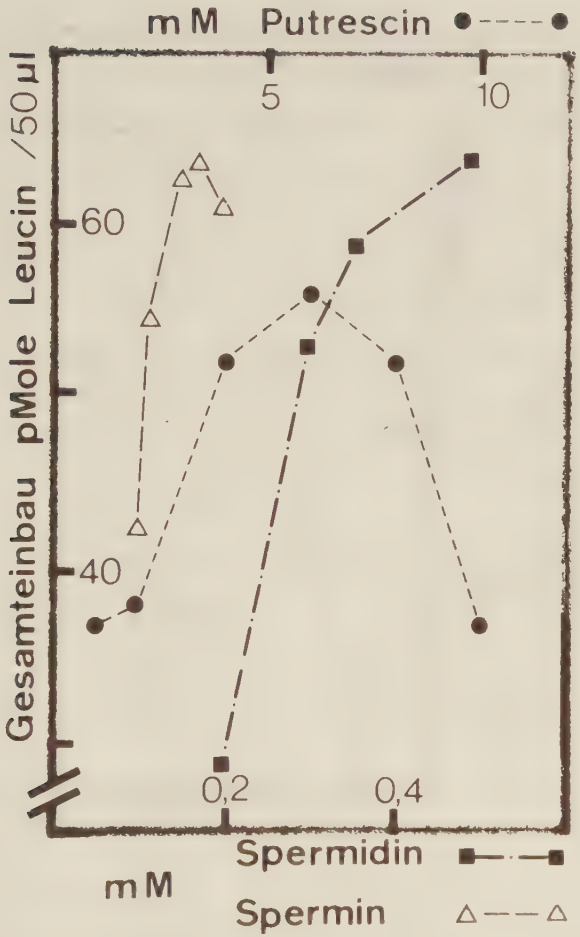



Abb. 13 Gesamteinbaustimulation im Weizenkeimsystem durch die Polyamine, Spermin, Spermidin und Putrescin. Synthesebedingungen: 2 mM $Mg^{++}$ und 85 mM $K^{+}$. (Syntheseansatz siehe 3.1.1).

teinbiosynthese $Mg^{++}$ konzentrationsabhängig ist, wurden in einem weiteren Versuch verschiedene $Mg^{++}$-Konzentrationen mit verschiedenen Spermidinkonzentrationen getestet (Abb. 14).

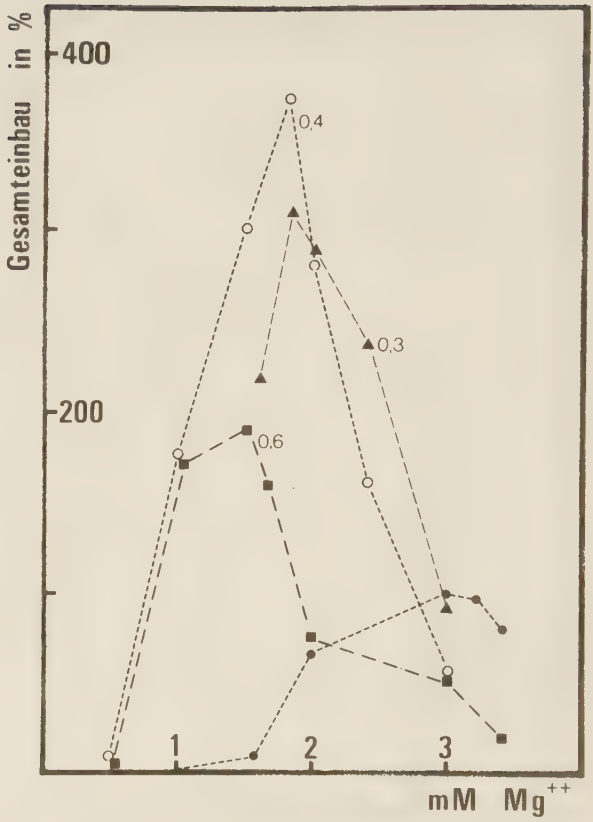
Abb. 14

Leucin-Gesamteinbauabhängigkeit von der $Mg^{++}$- und Spermidinkonzentration in %.

100 % = Gesamteinbau bei maximaler $Mg^{++}$-Konzentration (3 mM). Spermidinkonzentrationsangabe in mM an den jeweiligen Kurven.

(●---●) $Mg^{++}$-Konzentrationsabhängigkeit ohne Spermidin.

Synthesebedingungen: 90 mM $K^{+}$. (Syntheseansatz siehe 3.1.1).




Die Einbaustimulierung des Spermidins ist stark $Mg^{++}$-konzentrationsabhängig. Das Einbauoptimum aller getesteten Spermidinkonzentrationen liegt bei 1,6 - 2,2 mM $Mg^{++}$, das $Mg^{++}$-Optimum im spermidinfreien System bei 3 mM. Abb. 14 zeigt ferner, daß eine weitere Erhöhung der Spermidinkonzentration wie in Abb. 13 getestet eine Hemmung des $^{3}H$-Leucineinbaus bedeutet. Das Syntheseoptimum bezüglich des Leucin-Gesamteinbaus liegt bei 0,4 mM Spermidin und 2 mM Magnesium.

### 3.1.4 Leucinabhängigkeit des Gesamteinbaus

Da bei der zellfreien Proteinbiosynthese $^{3}$H-Leucin in die Proteinketten eingebaut werden soll, gilt es hier, das Einbauoptimum zu ermitteln. Es wurde der Gesamteinbau und der lösliche Einbau bestimmt. Dazu wurde das System nach der Translation bei 226 000 g (50 000 rpm im Beckman Rotor Ti 50) 60 min lang zentrifugiert und im Überstand der Einbau ermittelt (siehe Methoden). In Abb. 15 ist ein solcher Versuch mit mRNA's aus verschiedenen Rattenlebern zusammengefaßt.

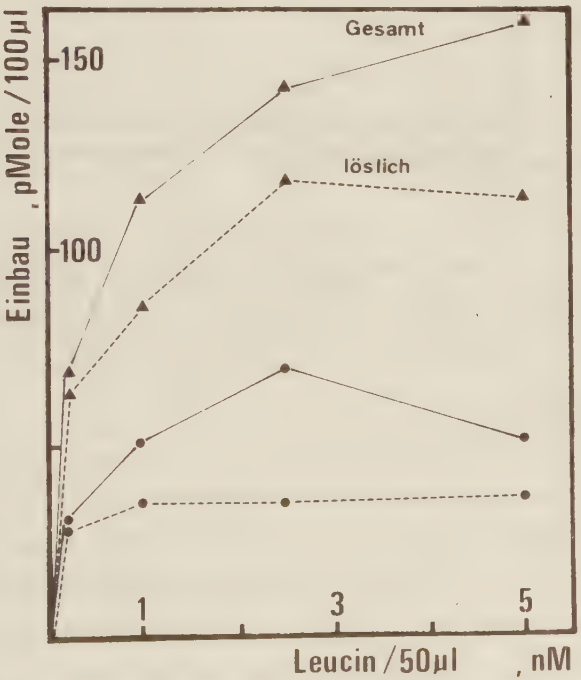



Abb. 15

Leucinabhängigkeit des Gesamteinbaus (——) und des löslichen Einbaus (----). Zwei RNA's aus verschiedenen Rattenlebern wurden getestet. (Syntheseansatz siehe 3.1.1).

Der Einbau im 226 000 g-Überstand hat bei 2,5 n Molen Leucin/50 µl Ansatz sein Optimum. Da bei den weiteren Versuchen aus diesem Überstand mit spezifischen Antiseren TAT und TO präzipitiert werden, gilt es, für das System eine optimale Leucinkonzentration zu ermitteln. Bei 850 p Molen Leucin/ 50 µl Ansatz sind im ungünstigsten Fall 65 % des maximalen löslichen Einbaus erreicht. Da der Gesamtanteil an TAT- und TO-mRNA in der Gesamt-mRNA sehr gering ist, muß entsprechend hoch mit $^{3}$H-Leucin markiert werden, um auf dem Autoradiogramm die Syntheseprodukte noch identifizieren und quantifizieren zu können. Die Leucinkonzentration von 850 p Molen/50 µl Ansatz wurde deshalb mit einem Leucin von 48 - 60 Ci/mMol hergestellt.

### 3.1.5 Abhängigkeit der TAT- und TO-Synthese von der Kalium- und Spermidinkonzentration

Wie gezeigt werden konnte, stimuliert Spermidin den Gesamteinbau. Es war nun abzuklären, inwieweit das Spermidin speziell die TAT- und TO-Synthese stimulieren kann; der Versuch wurde gleichzeitig bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen durchgeführt.

Zur Bestimmung der spezifischen TAT- und TO-Synthese wurden die radioaktiven TAT- und TO-Proteinemit den dazugehörenden Antiseren unter Zugabe von kalten Carrierenzymen aus dem 226 000 g-Überstand des Syntheseansatzes präzipitiert, gewaschen, aufgelöst, einer SDS-Flachgelelektrophorese unterworfen, autoradiographiert und die radioaktiven Banden ausgeschnitten und gezählt. Alle Einzelheiten dazu sind unter

Material und Methoden zusammengefaßt.

Der Versuch in Abb. 16 zeigt, daß die TO-Synthese stärker kalium- und spermidinabhängig ist als die TAT-Synthese. Ein gemeinsames Maximum liegt bei 87 $K^+$ und 0,4 - 0,5 mM Spermidin.

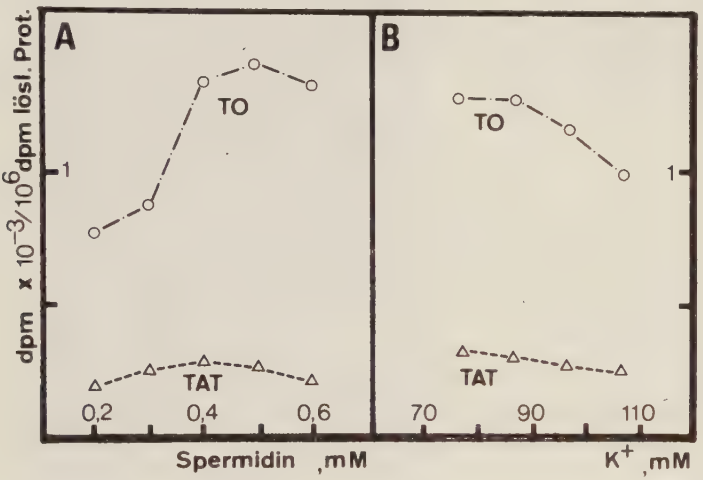



Abb. 16 Abhängigkeit der TAT- und TO-Synthese von der Spermidin- (A) und Kaliumkonzentration (B). Kaliumabhängigkeit bei 0,5 mM Spermidin, Spermidinabhängigkeit bei 107 mM $K^+$ bestimmt. (Syntheseansatz siehe 3.1.1).

## 3.2 Identifizierung der mit den Anti-TAT- und Anti-TO-Seren präzipitierten Produkte

Für weitere Versuche mußte nachgewiesen werden, daß die im Autoradiogramm aufgetretenen Banden in ihrer Position dem "in vivo"-Produkt entsprechen. Dazu wurde unter Induktionsbedingungen ein 100 000 g-$^3$H-Rattenleberüberstand erstellt (siehe Methodenteil).

Abb. 17 A

TO-Synthese im Weizenkeimsystem, mit Anti-TO-γ-Globulin präzipitiertes Produkt aus dem System (WG-S 30) und aus einem $^{3}$H-markierten 100 000 g-Rattenleberüberstand (L).

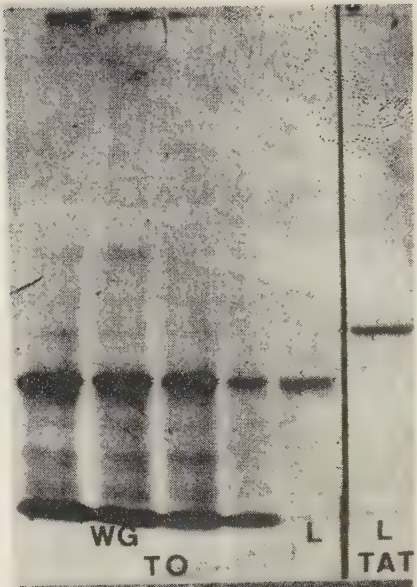
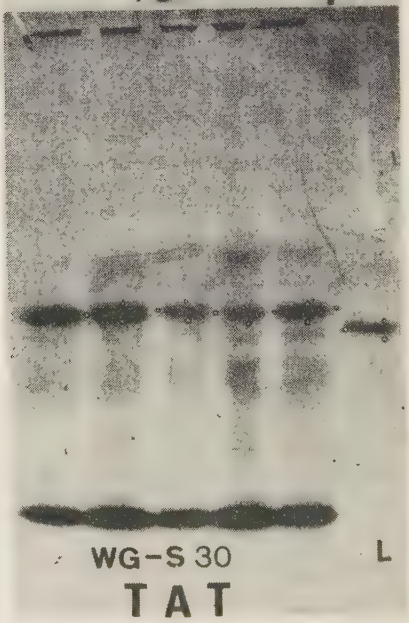



Abb. 17 B

TAT-Synthese im Weizenkeimsystem, mit Anti-TO-γ-Globulin präzipitiertes Produkt aus dem System (WG-S 30) und aus einem $^{3}$H-markierten 100 000 g-Überstand (L).



Ein mit Antiseren gewonnenes Produkt aus diesem Überstand muß in der gleichen Position wie das "in vitro"-Produkt laufen. Für die TO ist die Identifizierung problemlos (Abb. 17 A), das "in vivo"-Produkt läuft in der gleichen Position wie das "in vitro"-Produkt. Bei der TAT (Abb. 17 B) zeigt sich jedoch ein überraschendes Ergebnis. Das mit Anti-TAT-Serum präzipitierte Syntheseprodukt läuft höhermolekular als das "in vivo"-Produkt aus der Rattenleber.

## 3.3. Diskussion

Durch Zugabe poly-A-haltiger mRNA kann die Einbauaktivität des Weizenkeimsystems auf das 14 - 23fache stimuliert werden. Dabei ist die Einbaurate während der ersten 30 Minuten linear, nach 90 Minuten kommt der Einbau zum Stillstand. Deshalb wurden alle weiteren Translationen 60 Minuten lang bei 30° C inkubiert. Bei einer mRNA-Konzentration von 80 µg/ml hat das Weizenkeimsystem sein Einbauoptimum erreicht. Höhere mRNA-Konzentrationen hemmen das System. Wie die meisten zellfreien Proteinbiosynthesesysteme so ist auch das Weizenkeimsystem betreffs seiner Translationsaktivität von der Anwesenheit von Polyaminen abhängig (28). Es konnte gezeigt werden, daß Spermidin und Spermin den Gesamteinbau auf das 4 - 5fache steigern können. Alle weiteren Translationen wurden mit Spermidin durchgeführt, da Spermin nur innerhalb enger Konzentrationsgrenzen stimuliert (Abb. 13). Die Proteinbiosyntheseaktivität eines zellfreien Systems ist generell von der Magnesiumkonzentration abhängig. Deshalb wurde die Leucineinbauabhängigkeit bei verschiedenen Spermidin- und Magnesiumkonzentrationen

ermittelt. Das Syntheseoptimum lag bei 0,4 mM Spermidin und 2 mM Magnesium. Da während der Translation radioaktives Leucin in die Proteinketten eingebaut wird, wurde auch hier die Einbauabhängigkeit ermittelt. Das Einbaumaximum liegt hier bei 2,5 nM Leucin/50 µl. In die löslichen Proteine werden nur 50 - 70 % des eingesetzten Leucins, bezogen auf den Gesamteinbau, inkorporiert. Die restlichen 30 - 50 % verbleiben wohl an den nascenten Polypeptidketten der Polysomen. Ob die für den Gesamteinbau bestimmten Optima auch für die gezielte TAT- und TO-Synthese am effektivsten waren, mußte in einem weiteren Versuch abgeklärt werden. Interessant war hier der Befund, daß die Tyrosinaminotransferase im Gegensatz zur Tryptophanoxygenase-Synthese in weiten Bereichen von der Spermidin- und Kaliumkonzentration unabhängig war (Abb. 16). Die TO-Synthese hatte ihr Maximum bei 0,5 mM Spermidin und 80 mM Kalium. Da für spätere Versuche beide Enzyme in einem Syntheseansatz synthetisiert werden sollten, wurden alle weiteren Translationen bei 87 mM Kalium, 0,4 - 0,5 mM Spermidin und 2 mM Magnesium durchgeführt.

Wie die Versuche zeigten, kann aus poly-A-haltiger Gesamt-mRNA aus Rattenleber im Weizenkeimsystem Tryptophanoxygenase synthetisiert werden. Das im System synthetisierte und mit Anti-TO-γ-Globulin präzipitierte Syntheseprodukt läuft im SDS-Polyacrylamidgel in der gleichen Position wie die TO aus einem $^{3}H$-markierten 100 000 g Überstand und wie gereinigte TO aus Rattenleber.

Ein völlig anderes Ergebnis zeigt sich bei Synthese der Tyrosinaminotransferase. Offensichtlich ist hier das Synthese-

produkt höher molekular als das aus einem $^{3}$H-markierten 100 000 g-Überstand präzipitierte Produkt. Es stellte sich die Frage, ob die Bildung dieser höhermolekularen TAT-Untereinheit systemspezifisch ist. Dies sollte durch die Synthese dieses Enzyms in einem Retikulozytensystem abgeklärt werden.

Spätere Versuche bewiesen, daß der hier benutzte Antikörper TAT-spezifisch ist. So konnte auch gezeigt werden, daß diese höhermolekulare Proteinbande nicht auftritt, wenn aus unstimuliertem Weizenkeimsystem (ohne exogene mRNA) präzipitiert wird (Abb.22). Präzipitation mit einem Serum von einem nicht immunisierten Kaninchen zeigte ebenfalls keine Bande (Abb. 24). Spätere in einem anderen Kapitel beschriebene Versuche schlossen auch ein Kreuzreagieren des Antikörpers aus.

# 4. SYNTHESE VON TYROSINAMINOTRANSFERASE UND TRYPTOPHANOXYGENASE IM RETIKULOZYTENSYSTEM

TAT und TO werden im Weizenkeimsystem durch Translation von poly-A-haltiger Gesamt-mRNA synthetisiert. Wie jedoch gezeigt werden konnte, läuft das mit Anti-TAT-Serum präzipitierte Produkt in der SDS-Disk Elektrophorese in einer Position, die einer höhermolekularen Untereinheit wie die in vivo bekannte von 50000 Dalton entspricht. Um abzuklären, ob diese höhermolekulare TAT-Untereinheit ein weizenkeimspezifisches Phänomen ist, wurde Gesamt-mRNA aus Rattenleber im Retikulozytensystem zur Translation gebracht.

## 4.1 Charakterisierung des Systems

Die Behandlung der Kaninchen und die Zubereitung des Retikulozytenlysats sind im Methodenteil beschrieben, die Inkubationstemperatur und die Konzentrationsangaben sind der Arbeit von PELHAM et al. (29) entnommen.

### 4.1.1 Zeitabhängigkeit des Gesamteinbaus

Mit Hilfe des Einbaus von $^{3}$H-markiertem Leucin in Protein kann die Syntheseaktivität des Retikulozytensystems getestet werden. Dazu wurde frisch aufgetautes Lysat mit einer 1 mM-Häminlösung, 20 mM Tris HCl, 50 mM KCl in 90%igem Äthylanglykoll (pH 8,2) und Kreatinphosphokinase (5 mg/ml in 50%igem Glycerin) angereichert:

| | |
|---|---|
| 280 µl Lysat<br>30 µl Kinase<br>8 µl Hämin | 0° C |
| 320 µl Lysat, angereichert | |

Eine Stammlösung aus folgenden Reagenzien wurde je nach Ansatzvolumen in Eppendorfröhren eingefüllt und lyophylisiert:

Stammlösung =
200 µl Kreatinphosphat (200 mM)
200 µl KCl (2 M); $MgCl_2$ (10 mM)
40 µl 18-L-Aminosäuren (5 mM) (ohne Leu und Met)
40 µl L-Leucin (5 mM)
40 µl L-Methionin (5 mM)
480 µl $H_2O$ bidest.
1000 µl

Für ein 40 µl-Ansatz werden 10 µl dieser Stammlösung im Eppendorfröhrchen lyophylisiert.

Typischer 40 µl-Ansatz:

10 µl Stammlösung (lyophylisiert)
32 µl Lysat, angereichert
2 µl $^3$H-Leucin (48 - 60 Ci/mMol)
} 0° C
34 µl
6 µl Volumen für mRNA, andere Reagenzien oder $H_2O$ bidest.
= 40 µl

Der Ansatz wird 60 min bei 26° C inkubiert. Zur Bestimmung des Gesamteinbaus, das heißt Einbau in lösliche Proteine und in die nascenten Polypeptidketten an den Polysomen, werden 10 µl Ansatz in 1 ml $H_2O$ verdünnt und wie bei PELHAM et al. (29) bestimmt (Methodenteil).

Wie aus Abb. 18 ersichtlich ist, ist der Gesamteinbau nur in den ersten 20 min linear. Bezieht man das eingesetzte $^3$H-Leucin auf die gesamte extern zugegebene Leucinkonzentration und berücksichtigt die Zählausbeute von 20 % (siehe Methodenteil), dann ergibt sich bei diesem Retikulozytenlysat eine Einbaurate von 680 p Mole Leucin/50 µl Ansatz und 60 min. Die in dieser

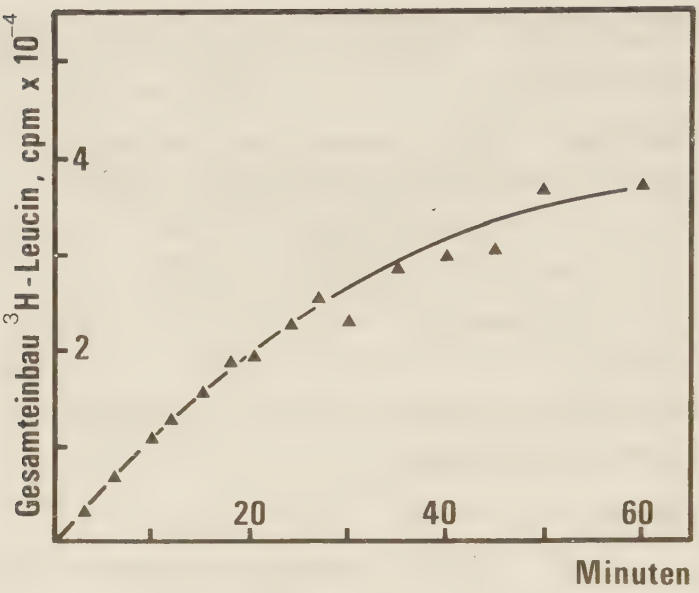



Abb. 18 Zeitabhängigkeit des $^3$H-Leucin-Gesamteinbaus im Retikulozytensystem. Testansatz 40 µl.

Arbeit verwendeten Lysate lagen in ihrer Einbaurate zwischen 180 - 680 p Mole Leucin/50 µl Ansatz bei einer Inkubationszeit von 60 min.

### 4.1.2 Nucleasebehandlung des Lysats

Setzt man dem beschriebenen Retikulozytensystem exogene mRNA aus der Rattenleber zu, so kommt es zu keiner Stimulierung der Syntheserate; das System wird eher durch Zugabe von mRNA aus Rattenleber massiv gehemmt:

| µg mRNA/ml Ansatz | Gesamteinbaurate in 5 µl Ansatz |
|---|---|
| - | 8608 cpm |
| 150 | 4097 cpm |
| 300 | 2393 cpm |

Wenn man den endogenen Messenger des Retikulozytensystems zerstört, kann dadurch die Translation exogener mRNA erhöht werden. Nach PELHAM et al. (29) verdaut die calziumabhängige Nuclease aus Staphylococcus aureus (EC 3.1.4.7) endogene mRNA im System. Vor Zugabe exogener mRNA wird das Calzium im System durch Zugabe von EGTA (Bis-(aminoäthyl)-glycoläther-N,N,N',N'-tetraessigsäure) spezifisch chelatisiert und die Nuclease dadurch gehemmt. Die Nucleasebehandlung wurde wie folgt durchgeführt:

| | |
|---|---|
| 320 µl Lysat angereichert (im Eppendorfgefäß mit lyophylisierter Stammlösung)<br>4 µl $CaCl_2$ 100 mM<br>4 µl Nuclease 1 mg/ml | 0° C |

Inkubation 10 min bei 20° C, dann Zugabe von

| | |
|---|---|
| 8 µl EGTA 100 mM<br>18 µl $^3$H-Leucin (48 - 60 Ci/mMol)<br>6 µl $H_2O$ bidest. | 0° C |

360 µl Lysat angereichert und nucleasebehandelt.

Ein 40 µl-Ansatz setzt sich dann aus 36 µl des angereicherten und nucleasebehandelten Lysats und 4 µl mRNA oder $H_2O$ bidest. zusammen.

Nach Nucleasebehandlung kann durch Zugabe von mRNA aus Rattenleber die Einbaurate wieder auf 10 - 15 % der Einbaurate des unbehandelten Systems gesteigert werden:

| Nuclease-behandlung | µg mRNA/ml Ansatz | Gesamteinbau/ 5 ml (cpm) | % Gesamteinbau |
|---|---|---|---|
| - | - | 8608 | 100 |
| + | a) 100 | 1212 | 14 |
| + | b) 50 | 2152 | 25 |
| + | - | 309 | 4 |

a) mRNA aus Rattenleber; b) Globin-mRNA vom Kaninchen.

Das Ergebnis zeigt, das homologe Globin-mRNA besser akzeptiert wird, obwohl mit 50 µg mRNA/ml das System sicher noch nicht abgesättigt ist. Der endogene Gesamteinbau konnte auf 1 - 4 % herabgesetzt werden.

4.1.3 mRNA-Konzentrationsabhängigkeit des nucleasebehandelten Lysats

Wie im Weizenkeimsystem ist auch die Einbaurate des Retikulozytensystems von der Konzentration der angebotenen mRNA abhängig. Der nachfolgende Versuch zeigt, daß die Sättigungskonzentration wesentlich über der im Weizenkeimsystem gefundenen liegt.
Die in Abb. 19 eingesetzten zwei mRNA's unterscheiden sich in ihrer Einbaurate, die Konzentrationsoptima sind jedoch annähernd gleich und liegen bei 100 - 150 µg mRNA/ml System. Beide mRNA's unterscheiden sich im gleichen Verhältnis in der Höhe der Einbaumaxima, wenn man sie im Weizenkeimsystem testet.

4.1.4 Leucin-Konzentrationsabhängigkeit des nucleasebehandelten Systems

Für eine Identifizierung der radioaktiven Produkte auf dem Plattengel mittels Autoradiographie ist es notwendig, im Ein-

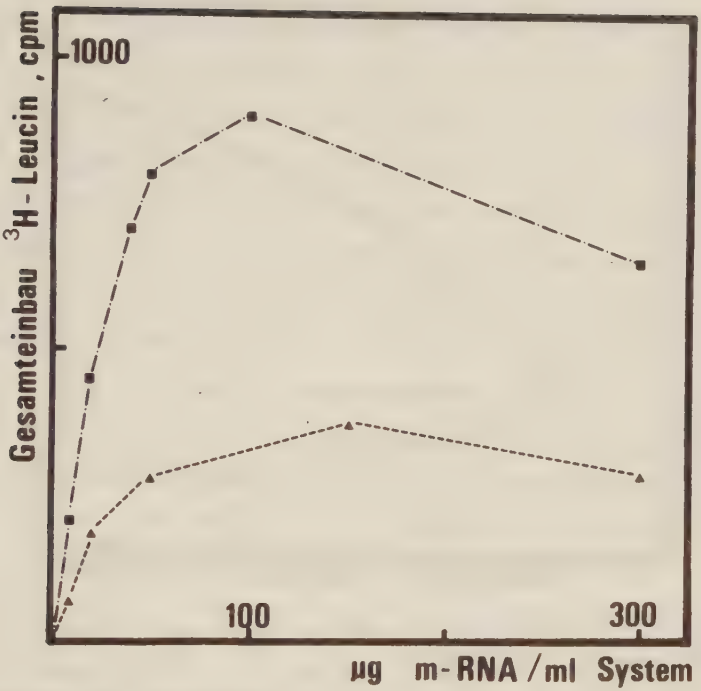



Abb. 19 Gesamteinbau von $^3$H-Leucin im Retikulozytensystem nach Nucleasebehandlung in Abhängigkeit von der poly-A-haltigen mRNA aus Rattenleber (40 µl-Ansätze, 5 µl davon $^3$H-gezählt). Es sind zwei verschiedene RNA-Präparationen eingesetzt. (Ansatz siehe 4.1.1).

baumaximum des $^3$H-Leucins zu arbeiten. Die aktuelle Aminosäurekonzentration im Retikulozytenlysat ist unbekannt, da das Lysat nicht wie der Weizenkeim S 30 Überstand dialysiert wird und somit dort die Aminosäurekonzentration Null ist.

In einem Versuch wurde nun zu nucleasebehandeltem Enzym poly-A-haltige mRNA aus Rattenleber bei verschieden zugegebenen Leucinkonzentrationen zur Translation gebracht und der Leucin-Gesamteinbau bestimmt.

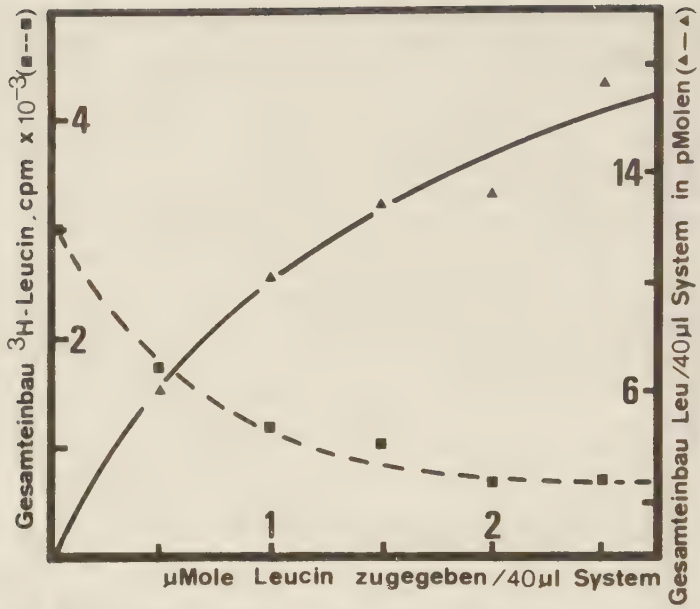



Abb. 20 Translation poly-A-haltiger mRNA aus Rattenleber im nucleasebehandelten System.
$^3$H-Gesamteinbau in 5 µl System bestimmt. Leucingesamteinbau berechnet ohne eine interne Leucinkonzentration in Rechnung zu setzen. $^3$H-Leucinkonzentration konstant (2 µl $^3$H-Leucin, 48 Ci/mMol und 1 µCi/µl pro 40 µl System). In der Stammlösung war kein Leucin enthalten. (40 µl-Ansätze siehe 4.1.1).

An Abb. 20 ist der Gesamt-Leucineinbau dargestellt, ohne den internen Leucingehalt des Lysats, der unbekannt ist, zu berücksichtigen. Durch das Vorhandensein einer internen konstanten Leucinkonzentration müßte bei steigender kalter zugegebener Leucinkonzentration und gleichbleibender $^3$H-Leucinkonzentration die cpm des Gesamteinbaus abfallen. In Abb. 20 ist der Kurvenverlauf eines solchen Versuchs dargestellt. Für jeden Punkt der Kurve muß ein Blindwert erstellt werden, der aus nucleasebehandeltem System ohne mRNA aber un-

terschiedlicher Leucinkonzentration besteht. Berücksichtigt man diese Werte und subtrahiert sie von den gegebenen, erhält man mit Ausnahme des Wertes bei interner Leucinkonzentration annähernd eine Gerade. Beim halbmaximalen cpm-Wert ist die Konzentration an externem, einschließlich dem radioaktiven Leucin und internem Leucin gleich groß. Bei dem oben beschriebenen Versuch ergibt das eine interne Leucinkonzentration von 2,25 nMolen in 40 µl Retikulozytensystem. Berücksichtigt man die so ermittelte interne Leucinkonzentration und berechnet nun erneut den Gesamt-Leucineinbau, so liegen alle neu errechneten Werte zwischen 30 - 39 p Molen Leucin-Gesamteinbau in 40 µl System. Das vergleichbare unbehandelte System baut bei Translation seiner internen mRNA 489 p Mole Leu/40 µl System ein, wenn man auch hier die ermittelte interne Leucinkonzentration in Rechnung stellt. Damit erhöht sich der Gesamteinbau des unbehandelten Retikulozytensystems auf 360 - 1100 p Mole Leucin/50 µl System und der Gesamteinbau des nucleasebehandelten Systems im exogenen mRNA-Optimum auf 30 - 50 p-Mole Leucin/50 µl System.

## 4.2 Synthese der Tyrosinaminotransferase und Tryptophanoxygenase im nucleasebehandelten Retikulozytensystem

Wegen der geringeren Gesamteinbaurate des nucleasebehandelten Retikulozytensystems bei Translation poly-A-haltiger mRNA gegenüber dem Weizenkeimsystem kann das Retikulozytensystem keine Alternative bei Reihenuntersuchungen von TAT und TO mRNA-Quantifizierungen aus Gesamt-mRNA-Translation sein.
Hier sollte nur untersucht werden, ob die TAT auch hier

wie beim Weizenkeimsystem in einer höhermolekularen Vorstufe synthetisiert wird. Zugleich wurde getestet, ob auch die TO in diesem System synthetisiert wird.

Dazu wurden 960 µl angereichertes Lysat mit 10 µl $CaCl_2$ 100 mM und 10 µl Nuclease 1 mg/ml 12 min lang bei 20° C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl EGTA 100 mM gestoppt. Die 1 000 µl des nucleasebehandelten Systems wurden in ein Corex Glas transferiert, in dem zuvor 1 ml $^3$H-Leucin (60 Ci/mmol und 1 mCi/ml) lyophylisiert waren. Dazu kamen:

| | |
|---|---|
| 12 µl | mRNA (4 µg/ml) |
| 60 µl | Kreatinphosphat |
| 60 µl | KCl 2M, $MgCl_2$ 10 mM |
| 12 µl | 18 Aminosäuren 5mM |
| 12 µl | L-Met 5 mM |
| 44 µl | $H_2O$ bidest. |
| 1200 µl | Gesamtansatz |

Dieser Ansatz wurde 60 min bei 26° C inkubiert und danach wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Das Ergebnis zeigt Abb. 21

Abb. 21

Identifizierung der im nucleasebehandelten Retikulozytensystem synthetisierten TAT (I) und TO. Der Pfeil (II) markiert die Lage der im SDS-Gel mitgelaufenen, aus Rattenleber isolierten TAT-Untereinheit. Belichtung: 8 Tage. (Ansatz siehe oben).

Aus Abb. 21 geht eindeutig hervor, daß die TAT auch hier in einer höhermolekularen Untereinheit synthetisiert wird. TO wird auch im nucleasebehandelten Retikulozytensystem synthetisiert.

## 4.3 Diskussion

Ist die Synthese einer höhermolekularen TAT-Untereinheit in vitro weizenkeimspezifisch?

Um diese Frage abzuklären, wurde versucht, TAT im Retikulozytensystem zu synthetisieren. Da das Retikulozytensystem mit einem Gesamteinbau von 1100 pMole Leucin/50 µl System gegenüber dem Weizenkeimsystem mit 3 - 5 pMolen/50 µl System einen zu hohen Background hat, wurde das Retikulozytensystem nach PELHAM et al. (29) nucleasebehandelt. Danach fällt der Leucin-Gesamteinbau auf 1 - 4 % des unbehandelten Systems ab. Im nucleasebehandelten System liegt das $^{3}$H-Einbauoptimum bei 100 - 150 µg mRNA/ml System, während das Weizenkeimsystem bei einer mRNA-Konzentration von 80 µg/ml System optimal arbeitet. Vergleicht man die Einbauraten beider Systeme (nucleasebehandeltes Retikulozytensystem 30 - 50 pMole Leu/50 µl, Weizenkeimsystem 80 - 150 pMole Leu/50 µl) in ihrem mRNA-Optimum, so liegt der Einbau beim Weizenkeimsystem 3 - 4mal höher. Bezieht man den Einbau auf die zugegebene mRNA, dann ist der Einbauunterschied noch höher (6fach). Der Vorteil des Weizenkeimsystems liegt eindeutig in der höheren Syntheseaktivität.

Das ermittelte Einbauverhältnis von unbehandeltem und nucleasebehandeltem Lysat stimmt gut mit dem Ergebnis von DIESTERHAFT et al. (30) überein. Synthesebedingungen bezüglich der Kalium-

Magnesium- und Häminkonzentrationen, wie sie hier zur Anwendung kamen, wurden auch von DIESTERHAFT et al. (30) mit Erfolg für die Synthese der TAT benutzt. Im Gegensatz zu dieser Arbeitsgruppe zeigt das hier gebildete Syntheseprodukt die gleiche höhermolekulare Untereinheit wie sie schon im Weizenkeimsystem gebildet wurde. DIESTERHAFT et al. (30) machen jedoch keinerlei Angaben zum Molekulargewicht ihres Syntheseproduktes. Ihre gereinigte Reverenz-TAT lassen sie auf einem separaten Gel laufen und wollen so nachweisen, daß beide Molekulargrößen identisch sind. Ein Wanderungsunterschied von 2 - 3 mm bei einer Trennlänge von 7 - 8 cm, wie er auftritt, wenn das Syntheseprodukt und gereinigte TAT in einem Platten-Gel aufgetrennt werden, kann man in zwei getrennten Gelen sicherlich nicht nachweisen.

Das Auftreten eines höhermolekularen Syntheseproduktes in vitro ist also nicht nur weizenkeimspezifisch, sondern kann auch im nucleasebehandelten Retikulozytensystem nachgewiesen werden. Um weiter abzuklären, inwieweit diese höhermolekulare Bande eine echte TAT-Vorstufe darstellt, waren weitere Versuche notwendig. Diese sollen im nachfolgenden Kapitel beschrieben werden.

Auch die Tryptophanoxygenase kann im Retikulozytensystem bei den gleichen Synthesebedingungen synthetisiert werden. Sie wandert im SDS-Gel auch hier in die gleiche Position wie im Weizenkeimsystem und hat somit das selbe Molekulargewicht wie das in vivo-Enzym.

# 5. HÖHERMOLEKULARE TAT-UNTEREINHEIT IN VITRO: WEITERE VERSUCHE ZUR ABKLÄRUNG

## 5.1 Vergleich des Anti-TAT-Serums mit einem fremden Anti-TAT-γ-Globulin

Das für die TAT-Präzipitationen verwendete Antiserum zeigt einen hohen Anti-TAT-γ-Globulingehalt (2.7). Damit kann das Argument, die gefundene Bande sei eventuell unspezifisch, entkräftet werden.

Einen weiteren Hinweis auf Spezifität des benutzten Anti-TAT-Serums ist ein direkter Vergleich mit einem anderen Anti-TAT-Serum. Abb. 22 zeigt die Autoradioradiographie eines Präzipitats mit dem hier benutzten Antikörper (A) und einem Anti-TAT-γ-Globulin (B) von der Arbeitsgruppe ROEWEKAMP.

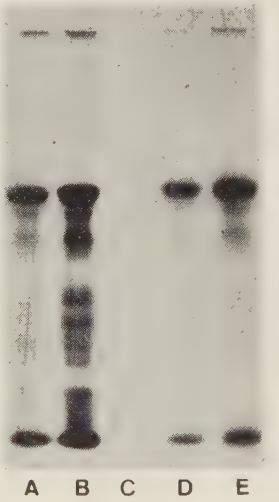



Abb. 22

Autoradiogramm einer SDS-Gelelektrophorese.
TAT aus Weizenkeimsystem präzipitiert mit Anti-TAT-γ-Globulin von ROEWEKAMP (B);
Weizenkeim-Syntheseansatz ohne externe mRNA (C);
Präzipitation mit TAT vorbehandeltem Antiserum (D) und (E).
Weitere Einzelheiten im Text.
Alles 200 µl-Weizenkeimsyntheseansätze.

Zwischen beiden Antikörpern ist betreffs der Lage der TAT-Untereinheit kein Unterschied festzustellen. Der Antikörper

präzipitiert mehr Nebenbanden (Abb. 22 B). In C ist ein Kontrollversuch dargestellt, das Weizenkeimsystem synthetisiert ohne Zusatz exogener mRNA keine nachweisbare TAT, nach Behandlung mit Anti-TAT-Serum bekam man aufgrund der zugesetzten kalten TAT im 100 000 g Überstand zwar ein Präzipitat, aber weder neu synthetisierte radioaktive TAT noch andere radioaktive Banden werden sichtbar.

Um zu prüfen, ob die Präzipitation der "in vitro" höhermolekularen TAT-Untereinheit Anti-TAT-γ-Globulin-spezifisch ist, wurde das Anti-TAT-Serum mit gereinigter TAT vorbehandelt:

40 µl Antiserum
150 µl Waschpuffer
10 µl TAT, 2 µg

Inkubation 12 Stunden, 4° C,
danach Präzipitat abzentrifugiert.

In Abb. 22 D wurde mit 50 µl, in E mit 100 µl dieses so behandelten Serums präzipitiert. Gegenüber A zeigt sich in C ein Abfall der Radioaktivität in der höhermolekularen Bande der TAT-Untereinheit. Das kann nur dahingehend interpretiert werden, daß durch Ausverdünnung des Serums mit gereinigter TAT die Konzentration an spezifischem Anti-TAT-γ-Globulin abnimmt und es somit zu einer Äquivalenzpunktverschiebung kommt. Durch Verdoppelung des verdünnten Serums in E kommt es wieder zum gleichen Bild wie in A. Die höhermolekulare Bande ist also Anti-TAT-γ-Globulin-spezfisch. Mit diesem Versuch kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um ein kreuzreagierendes Produkt handelt.

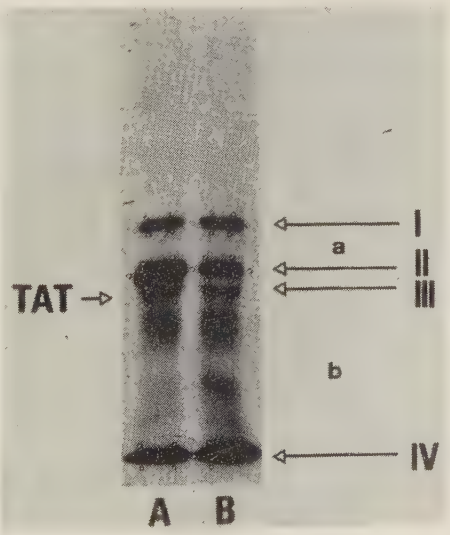
## 5. 2. Versuch eines Processing der in vitro synthetisierten TAT-Untereinheit durch ein Rattenleberhomogenat

Man könnte spekulieren, daß eine eventuell in vivo gebildete höhermolekulare TAT-Untereinheit sofort nach ihrer Translation auf ihr "in vivo"-Molekulargewicht durch eine Protease zurechtgeschnitten würde. Geht man weiter von der Annahme aus, daß eine solche Protease möglicherweise in einem Rattenleberhomogenat präsent sein könnte, müßte man eine in vitro gebildete TAT-Untereinheit durch Behandlung mit einem solchen Homogenat eventuell umwandeln können. Abb. 23 zeigt diesen Versuch.

Abb. 23

Behandlung der in vitro gebildeten TAT-Untereinheit mit Rattenleberhomogenat. Einzelheiten siehe Text. Das Autoradiogramm wurde 8 Tage lang belichtet. TAT markiert die Position des "in vivo" Enzyms.

A) Syntheseprodukt des Weizenkeimsystems.
B) Nach der Behandlung mit Leberhomogenat.




Dazu wurden 400 µl eines Weizenkeimsyntheseansatzes geteilt und 200 µl wie unter Methoden beschrieben behandelt und das Präzipitat wie üblich im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 23 A). Zu den restlichen 200 µl des Weizenkeimsyntheseansatzes gab man vor der Abzentrifugation der Polysomen 200 µl eines frisch

zubereiteten Leberhomogenats (Leber 1:4 mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) 0,14 M NaCl verdünnt und gepottert), inkubierte 60 min bei 37° C und behandelte danach wie üblich (Abb. 23 B). Die radioaktiven Banden (I - IV) wurden ausgeschnitten und gezählt, a und b in Abb. 23 geben die Summe der Radioaktivität in den Zwischenräumen an:

| Bande | dpm A | dpm B |
|---|---|---|
| I | 1247 | 1469 |
| a | 474 | 498 |
| II | 4361 | 1822 |
| III | 1865 | 1474 |
| b | 5504 > 9650 | 5875 > 11403 |
| IV | 4146 > | 5528 > |
| Σ | 17507 | 16666 |
| Σ - I | 16350 | 15197 |

Bei der Bande I handelt es sich um Albumin (31), welches unspezifisch an das Präzipitat bindet. Die Bande findet sich auch, wenn aus einem normalen Syntheseansatz mit normalem Kaninchenserum präzipitiert wird (Abb. 24). Die eigentliche in vitro TAT-Bande (II) verringert sich nach Leberhomogenatbehandlung auf 42 %, ohne daß die Bande III in ihrer Radioaktivität zunimmt. Bemerkenswert ist, daß die kleineren Proteinketten in b) und die Bande IV zunehmen. Wenn man annimmt, daß dieses Abbauprodukte oder unfertige TAT-Ketten sind und im Leberhomogenat Proteasen präsent sind, so könnte man diese Steigerung der Radioaktivität in b) und IV einem unspezifischen Abbau zuschreiben.

Aus diesem Versuch kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob es sich bei der Bande III überhaupt um eine TAT-Unter-

einheit handelt. Auffallend ist, daß diese Bande nur bei langen Belichtungszeiten zu sehen ist und anscheinend nur wie das Albumin ein Copräzipitat darstellt. Diese Bande läuft auch nicht in gleicher Position wie das aus einem 100 000 g-$^{3}$H-Überstand präzipitierte "in vivo"-Produkt. In Abb. 17 B ist das gut zu sehen. Die in vitro gefundene höhermolekulare Untereinheit der TAT scheint durch Behandlung mit Rattenleberhomogenat durch vorhandene Proteasen im Homogenat hydrolysiert, aber nicht zu einer Größe, die dem TAT-Molekulargewicht in vivo entspricht.

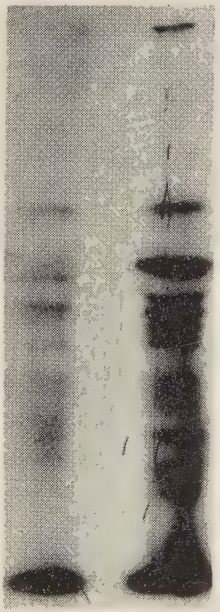


Abb. 24

Synthese von TAT im Weizenkeimsystem, rechte Bande: Syntheseprodukt mit Anti-TAT-Serum (10 µl) präzipitiert, linke Bande: Präzipitation mit Serum eines nicht immunisierten Kaninchens (40 µl), Mitte: wie links, jedoch 10 µl Serum. (Syntheseansatz siehe 3.1.1).

## 5.3 Dephosphorylierung der TAT

Tyrosinaminotransferase aus Rattenleber ist phosphoryliert und kann durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus E. coli

dephosphoryliert werden (LEE et al. (25)). Da es nicht sicher ist, ob die im Weizenkeim- oder Retikulozytensystem synthetisierte TAT-Untereinheit überhaupt phosphoryliert wird, war die Frage abzuklären, inwieweit die dephosphorylierte TAT-Untereinheit im SDS-Gel andere Laufcharakteristika entwickelt. Wie nach LEE et al. (25) wurde gereinigte TAT mit alkalischer Phosphatase behandelt und danach im SDS-Gel aufgetrennt.

Abb. 25

Behandlung von gereinigter TAT mit alkalischer Phosphatase aus E. coli.
SDS-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (siehe Methoden).
1) TAT + AP, 30 min 37° C inkubiert;
2), 4)) TAT, 30 min 37° C inkubiert;
3) wie 1), jedoch 30 min 0° C;
5) AP, 30 min 37° C inkubiert;
AP = alkalische Phosphatase aus E. coli.

Es war nach Phosphatasebehandlung kein Auftreten einer höhermolekularen Bande zu beobachten (Abb. 25). Das Ergebnis war zu erwarten, da Ladungsänderungen im Molekül durch das SDS abgefangen werden sollten.

## 5.4. Cyanbromidspaltung

Wie anfangs gezeigt werden konnte, präzipitiert das Anti-TAT-Serum aus einem 100 000 g Rattenleberüberstand mit $^{3}$H-Leucin markierten Proteinen (siehe Methodenteil) eine Bande, die im SDS-Gel genau in Position von gereinigter TAT läuft. Die Me-

thode der Wahl, um die $^{3}$H-"in vivo"-Bande, die $^{3}$H-"in vitro"-Bande und die gereinigte TAT-Untereinheit miteinander zu vergleichen, ist das Schneiden dieser Proteine mittels spezifischer Proteasen oder chemischer Agenzien und das Vergleichen der so entstandenen Peptide.

Da die höhermolekulare "in vitro" TAT-Untereinheit mengenmäßig sehr gering ist und nur im SDS-Gel über das Autoradiogramm nachzuweisen ist, wurde nach einer spezifischen Spaltung gesucht, die nur wenige Schnitte setzt, um die Radioaktivität in den erhaltenen Peptiden im Autoradiogramm noch nachzuweisen.

Hier bot sich die methioninspezifische Cyanbromidspaltung an, da VALERIOTE et al. (32) zeigen konnten, daß in der TAT-Untereinheit nur 12 Methioninmoleküle vorhanden sind. Maximal wären also 13 Peptide zu erwarten.

Versuchsdurchführung:

| $^{3}$H-TAT "in vitro" (Weizenkeimenzym) | $^{3}$H-TAT "in vivo" ($^{3}$H-Leberüberstand) | TAT isoliert aus Rattenleber |
|---|---|---|
| A | B | C |
| mit Anti-TAT-Serum präzipitiert aus einem 1000 µl Weizenkeimsynthese-ansatz | mit Anti-TAT-Serum präzipitiert aus 1000 µl 100000 g $^{3}$H-Leberüberstand | |
| SDS-Gelelektrophorese des aufgeschlossenen Präzipitats | | SDS-Gelelektrophorese von 40 µg gereinigter TAT |

Coomassie Färbung der Proteinbanden

| A | B | C |
|---|---|---|
| Ausschneiden eines Gelscheibchens 4 mm höher als die Bande in C | Ausschneiden eines Gelscheibschens in Höhe der Bande in C | Ausschneiden der Coomassie-gefärbten Bande |

Die ausgeschnittenen Gelscheibchen wurden in Eppendorfgefäßen mit einem Skalpell zerkleinert und im Lyophylisator getrocknet. Dazu gab man 300 µl einer 70%igen Ameisensäure mit 5 mg/ml Cyanbromid und inkubierte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Proben wurden lyophylisiert, mit 300 µl $H_2O$ versetzt, 30 min geschüttelt und erneut lyophylisiert. Dieses Waschen mit $H_2O$ wurde so oft wiederholt, bis ein pH von 6 erreicht war. Aufgeschlossen wurden die lyophylisierten Proben mit 200 µl Puffer wie unter Methoden beschrieben und die SDS-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (33) durchgeführt, wobei die Gelstückchen in größere Sammelgeltaschen eingefüllt wurden.

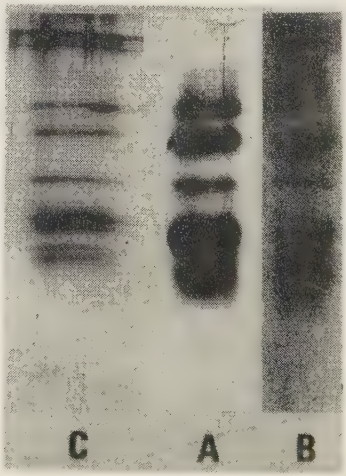



Abb. 26

Autoradiogramm der cyanbromidbehandelten "in vitro" (A) und "in vivo" (B) synthetisierten TAT-Untereinheiten. SDS-Gel 20%ig. Belichtungszeit des Autoradiogramms: 6 Wochen. Cyanbromidpeptide von gereinigter TAT (C).

Weitere Einzelheiten siehe Text.

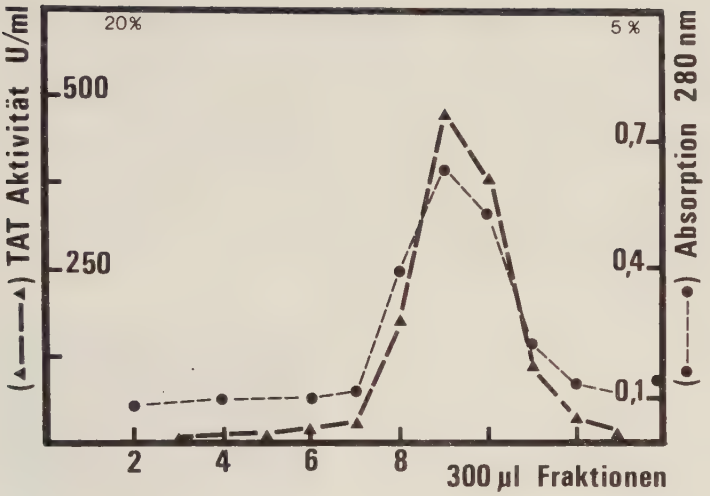



Abb. 7 Saccharosegradient (5 - 20 %) einer gereinigten TAT Präparation nach dem G-200-Schritt.
Zentrifugation im Beckman-Rotor SW 65 Ti bei 40000 rpm 10 Stunden.

Eine mit DEAE-Sepharose CL-4B durchgeführte Chromatographie mit einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer, 0,5 mM α-Ketoglutarat, 0,1 mM Pyridoxal-5'-phosphat, 1 mM DTE (pH 7,6) und einem linearen KCl Gradienten von 0 - 0,4 M in diesem Puffer ergab keine weitere Anreicherung. Im Gegensatz zum CM-50 Ionenaustauscher erscheint hier das Enzym in einem Peak.

## 2.6 Charakterisierung der gereinigten Tyrosinaminotransferase

### 2.6.1 Reinheitskriterien

Die gereinigte TAT zeigte nach der Harnstoffacrylamid-Gelelektrophorese nach REISFELD et al. (19) und nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach WEBER et al. (20) eine Proteinbande (Abb. 8).

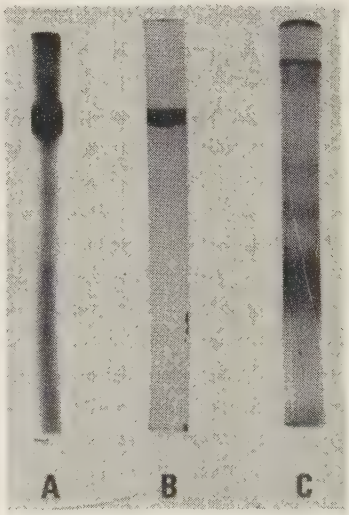



Abb. 8

A) Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach REISFELD et al. (19).

B) SDS-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (20).

C) Disk-Elektrohorese nach MILLER et al. (16). TAT-Aktivitätsfärbung nach VALERIOTE et al. (32).

Proben von 40 µg (A, B) und 1 µg (C) wurden aufgetragen.

Nach einer Aktivitätsfärbung der TAT im Disk-Polyacrylamidgel nach MILLER et al. (16) konnten 3 Enzymbanden lokalisiert werden. Diese drei Banden entsprechen den drei multiplen Formen wie sie bei der CM-50 Chromatographie auftreten (22).

Material und Methoden zusammengefaßt.

Der Versuch in Abb. 16 zeigt, daß die TO-Synthese stärker kalium- und spermidinabhängig ist als die TAT-Synthese. Ein gemeinsames Maximum liegt bei 87 $K^+$ und 0,4 - 0,5 mM Spermidin.

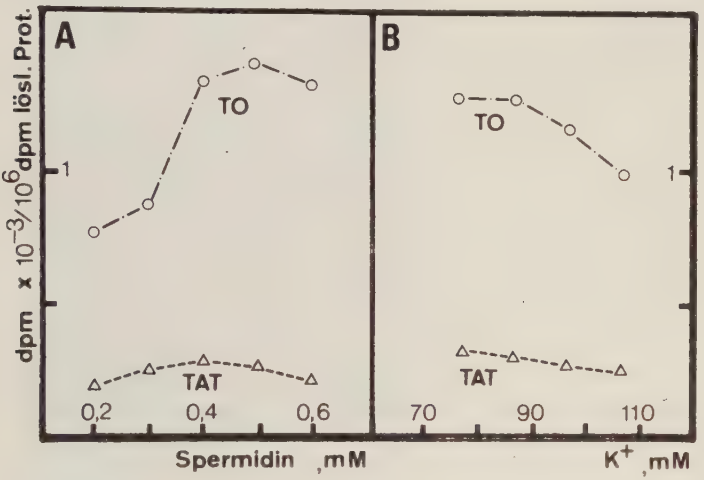



Abb. 16 Abhängigkeit der TAT- und TO-Synthese von der Spermidin- (A) und Kaliumkonzentration (B). Kaliumabhängigkeit bei 0,5 mM Spermidin, Spermidinabhängigkeit bei 107 mM $K^+$ bestimmt. (Syntheseansatz siehe 3.1.1).

## 3.2 Identifizierung der mit den Anti-TAT- und Anti-TO-Seren präzipitierten Produkte

Für weitere Versuche mußte nachgewiesen werden, daß die im Autoradiogramm aufgetretenen Banden in ihrer Position dem "in vivo"-Produkt entsprechen. Dazu wurde unter Induktionsbedingungen ein 100 000 g-$^3$H-Rattenleberüberstand erstellt (siehe Methodenteil).

Abb. 17 A

TO-Synthese im Weizenkeimsystem, mit Anti-TO-γ-Globulin präzipitiertes Produkt aus dem System (WG-S 30) und aus einem $^{3}H$-markierten 100 000 g-Rattenleberüberstand (L).

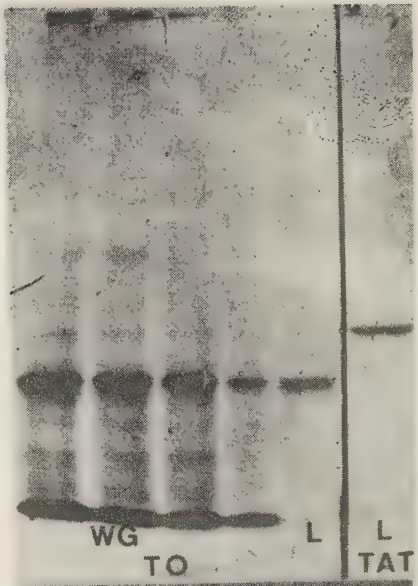
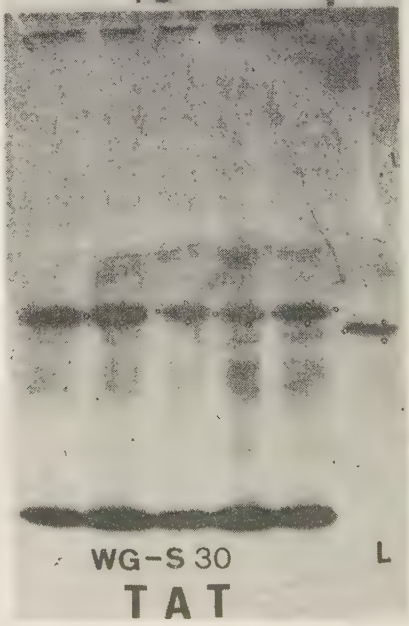



Abb. 17 B

TAT-Synthese im Weizenkeimsystem, mit Anti-TO-γ-Globulin präzipitiertes Produkt aus dem System (WG-S 30) und aus einem $^{3}H$-markierten 100 000 g-Überstand (L).



terschiedlicher Leucinkonzentration besteht. Berücksichtigt man diese Werte und subtrahiert sie von den gegebenen, erhält man mit Ausnahme des Wertes bei interner Leucinkonzentration annähernd eine Gerade. Beim halbmaximalen cpm-Wert ist die Konzentration an externem, einschließlich dem radioaktiven Leucin und internem Leucin gleich groß. Bei dem oben beschriebenen Versuch ergibt das eine interne Leucinkonzentration von 2,25 nMolen in 40 µl Retikulozytensystem. Berücksichtigt man die so ermittelte interne Leucinkonzentration und berechnet nun erneut den Gesamt-Leucineinbau, so liegen alle neu errechneten Werte zwischen 30 - 39 p Molen Leucin-Gesamteinbau in 40 µl System. Das vergleichbare unbehandelte System baut bei Translation seiner internen mRNA 489 p Mole Leu/40 µl System ein, wenn man auch hier die ermittelte interne Leucinkonzentration in Rechnung stellt. Damit erhöht sich der Gesamteinbau des unbehandelten Retikulozytensystems auf 360 - 1100 p Mole Leucin/50 µl System und der Gesamteinbau des nucleasebehandelten Systems im exogenen mRNA-Optimum auf 30 - 50 p-Mole Leucin/50 µl System.

## 4.2 Synthese der Tyrosinaminotransferase und Tryptophanoxygenase im nucleasebehandelten Retikulozytensystem

Wegen der geringeren Gesamteinbaurate des nucleasebehandelten Retikulozytensystems bei Translation poly-A-haltiger mRNA gegenüber dem Weizenkeimsystem kann das Retikulozytensystem keine Alternative bei Reihenuntersuchungen von TAT und TO mRNA-Quantifizierungen aus Gesamt-mRNA-Translation sein.
Hier sollte nur untersucht werden, ob die TAT auch hier

wie beim Weizenkeimsystem in einer höhermolekularen Vorstufe synthetisiert wird. Zugleich wurde getestet, ob auch die TO in diesem System synthetisiert wird.

Dazu wurden 960 µl angereichertes Lysat mit 10 µl $CaCl_2$ 100 mM und 10 µl Nuclease 1 mg/ml 12 min lang bei 20° C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl EGTA 100 mM gestoppt. Die 1 000 µl des nucleasebehandelten Systems wurden in ein Corex Glas transferiert, in dem zuvor 1 ml $^3$H-Leucin (60 Ci/mmol und 1 mCi/ml) lyophylisiert waren. Dazu kamen:

| | |
|---|---|
| 12 µl | mRNA (4 µg/ml) |
| 60 µl | Kreatinphosphat |
| 60 µl | KCl 2M, $MgCl_2$ 10 mM |
| 12 µl | 18 Aminosäuren 5mM |
| 12 µl | L-Met 5 mM |
| 44 µl | $H_2O$ bidest. |
| 1200 µl | Gesamtansatz |

Dieser Ansatz wurde 60 min bei 26° C inkubiert und danach wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Das Ergebnis zeigt Abb. 21

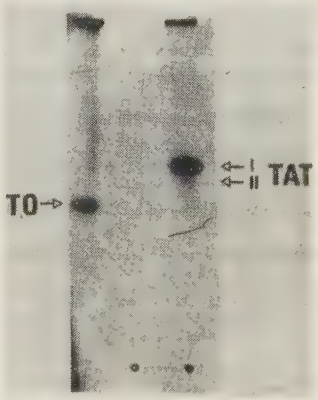



Abb. 21

Identifizierung der im nucleasebehandelten Retikulozytensystem synthetisierten TAT (I) und TO. Der Pfeil (II) markiert die Lage der im SDS-Gel mitgelaufenen, aus Rattenleber isolierten TAT-Untereinheit. Belichtung: 8 Tage. (Ansatz siehe oben).

## 5. HÖHERMOLEKULARE TAT-UNTEREINHEIT IN VITRO: WEITERE VERSUCHE ZUR ABKLÄRUNG

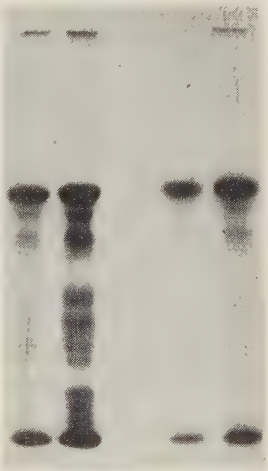
### 5.1 Vergleich des Anti-TAT-Serums mit einem fremden Anti-TAT-γ-Globulin

Das für die TAT-Präzipitationen verwendete Antiserum zeigt einen hohen Anti-TAT-γ-Globulingehalt (2.7). Damit kann das Argument, die gefundene Bande sei eventuell unspezifisch, entkräftet werden.

Einen weiteren Hinweis auf Spezifität des benutzten Anti-TAT-Serums ist ein direkter Vergleich mit einem anderen Anti-TAT-Serum. Abb. 22 zeigt die Autoradioradiographie eines Präzipitats mit dem hier benutzten Antikörper (A) und einem Anti-TAT-γ-Globulin (B) von der Arbeitsgruppe ROEWEKAMP.

Abb. 22

Autoradiogramm einer SDS-Gelelektrophorese.
TAT aus Weizenkeimsystem präzipitiert mit Anti-TAT-γ-Globulin von ROEWEKAMP (B);
Weizenkeim-Syntheseansatz ohne externe mRNA (C);
Präzipitation mit TAT vorbehandeltem Antiserum (D) und (E).
Weitere Einzelheiten im Text.
Alles 200 µl-Weizenkeimsyntheseansätze.




Zwischen beiden Antikörpern ist betreffs der Lage der TAT-Untereinheit kein Unterschied festzustellen. Der Antikörper

präzipitiert mehr Nebenbanden (Abb. 22 B). In C ist ein Kontrollversuch dargestellt, das Weizenkeimsystem synthetisiert ohne Zusatz exogener mRNA keine nachweisbare TAT, nach Behandlung mit Anti-TAT-Serum bekam man aufgrund der zugesetzten kalten TAT im 100 000 g Überstand zwar ein Präzipitat, aber weder neu synthetisierte radioaktive TAT noch andere radioaktive Banden werden sichtbar.

Um zu prüfen, ob die Präzipitation der "in vitro" höhermolekularen TAT-Untereinheit Anti-TAT-γ-Globulin-spezifisch ist, wurde das Anti-TAT-Serum mit gereinigter TAT vorbehandelt:

40 µl Antiserum
150 µl Waschpuffer
10 µl TAT, 2 µg

Inkubation 12 Stunden, 4° C,
danach Präzipitat abzentrifugiert.

In Abb. 22 D wurde mit 50 µl, in E mit 100 µl dieses so behandelten Serums präzipitiert. Gegenüber A zeigt sich in C ein Abfall der Radioaktivität in der höhermolekularen Bande der TAT-Untereinheit. Das kann nur dahingehend interpretiert werden, daß durch Ausverdünnung des Serums mit gereinigter TAT die Konzentration an spezifischem Anti-TAT-γ-Globulin abnimmt und es somit zu einer Äquivalenzpunktverschiebung kommt. Durch Verdoppelung des verdünnten Serums in E kommt es wieder zum gleichen Bild wie in A. Die höhermolekulare Bande ist also Anti-TAT-γ-Globulin-spezfisch. Mit diesem Versuch kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um ein kreuzreagierendes Produkt handelt.

## 5. 2. Versuch eines Processing der in vitro synthetisierten TAT-Untereinheit durch ein Rattenleberhomogenat

Man könnte spekulieren, daß eine eventuell in vivo gebildete höhermolekulare TAT-Untereinheit sofort nach ihrer Translation auf ihr "in vivo"-Molekulargewicht durch eine Protease zurechtgeschnitten würde. Geht man weiter von der Annahme aus, daß eine solche Protease möglicherweise in einem Rattenleberhomogenat präsent sein könnte, müßte man eine in vitro gebildete TAT-Untereinheit durch Behandlung mit einem solchen Homogenat eventuell umwandeln können. Abb. 23 zeigt diesen Versuch.

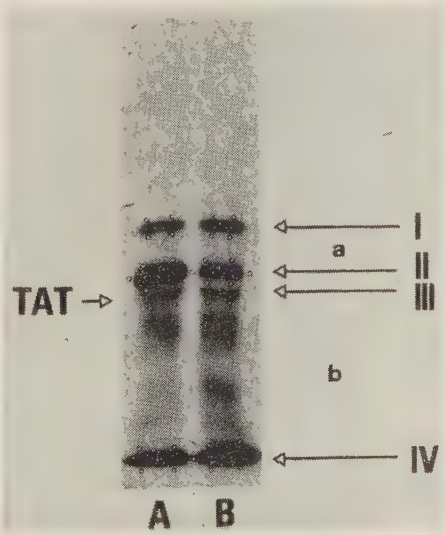



Abb. 23

Behandlung der in vitro gebildeten TAT-Untereinheit mit Rattenleberhomogenat. Einzelheiten siehe Text. Das Autoradiogramm wurde 8 Tage lang belichtet. TAT markiert die Position des "in vivo" Enzyms.

A) Syntheseprodukt des Weizenkeimsystems.
B) Nach der Behandlung mit Leberhomogenat.

Dazu wurden 400 µl eines Weizenkeimsyntheseansatzes geteilt und 200 µl wie unter Methoden beschrieben behandelt und das Präzipitat wie üblich im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 23 A). Zu den restlichen 200 µl des Weizenkeimsyntheseansatzes gab man vor der Abzentrifugation der Polysomen 200 µl eines frisch

zubereiteten Leberhomogenats (Leber 1:4 mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) 0,14 M NaCl verdünnt und gepottert), inkubierte 60 min bei 37° C und behandelte danach wie üblich (Abb. 23 B). Die radioaktiven Banden (I - IV) wurden ausgeschnitten und gezählt, a und b in Abb. 23 geben die Summe der Radioaktivität in den Zwischenräumen an:

| Bande | dpm A | dpm B |
|---|---|---|
| I | 1247 | 1469 |
| a | 474 | 498 |
| II | 4361 | 1822 |
| III | 1865 | 1474 |
| b | 5504 > 9650 | 5875 > 11403 |
| IV | 4146 / | 5528 / |
| Σ | 17507 | 16666 |
| Σ - I | 16350 | 15197 |

Bei der Bande I handelt es sich um Albumin (31), welches unspezifisch an das Präzipitat bindet. Die Bande findet sich auch, wenn aus einem normalen Syntheseansatz mit normalem Kaninchenserum präzipitiert wird (Abb. 24). Die eigentliche in vitro TAT-Bande (II) verringert sich nach Leberhomogenatbehandlung auf 42 %, ohne daß die Bande III in ihrer Radioaktivität zunimmt. Bemerkenswert ist, daß die kleineren Proteinketten in b) und die Bande IV zunehmen. Wenn man annimmt, daß dieses Abbauprodukte oder unfertige TAT-Ketten sind und im Leberhomogenat Proteasen präsent sind, so könnte man diese Steigerung der Radioaktivität in b) und IV einem unspezifischen Abbau zuschreiben.

Aus diesem Versuch kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob es sich bei der Bande III überhaupt um eine TAT-Unter-

einheit handelt. Auffallend ist, daß diese Bande nur bei langen Belichtungszeiten zu sehen ist und anscheinend nur wie das Albumin ein Copräzipitat darstellt. Diese Bande läuft auch nicht in gleicher Position wie das aus einem 100 000 g-$^{3}$H-Überstand präzipitierte "in vivo"-Produkt. In Abb. 17 B ist das gut zu sehen. Die in vitro gefundene höhermolekulare Untereinheit der TAT scheint durch Behandlung mit Rattenleberhomogenat durch vorhandene Proteasen im Homogenat hydrolysiert, aber nicht zu einer Größe, die dem TAT-Molekulargewicht in vivo entspricht.

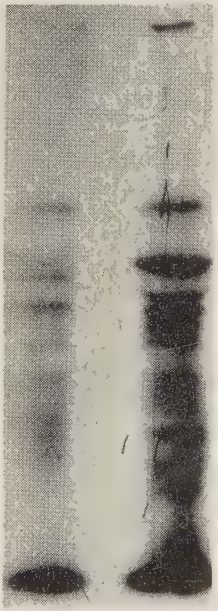


Abb. 24

Synthese von TAT im Weizenkeimsystem, rechte Bande: Syntheseprodukt mit Anti-TAT-Serum (10 µl) präzipitiert, linke Bande: Präzipitation mit Serum eines nicht immunisierten Kaninchens (40 µl), Mitte: wie links, jedoch 10 µl Serum. (Syntheseansatz siehe 3.1.1).

## 5.3 Dephosphorylierung der TAT

Tyrosinaminotransferase aus Rattenleber ist phosphoryliert und kann durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus E. coli

dephosphoryliert werden (LEE et al. (25)). Da es nicht sicher ist, ob die im Weizenkeim- oder Retikulozytensystem synthetisierte TAT-Untereinheit überhaupt phosphoryliert wird, war die Frage abzuklären, inwieweit die dephosphorylierte TAT-Untereinheit im SDS-Gel andere Laufcharakteristika entwickelt. Wie nach LEE et al. (25) wurde gereinigte TAT mit alkalischer Phosphatase behandelt und danach im SDS-Gel aufgetrennt.

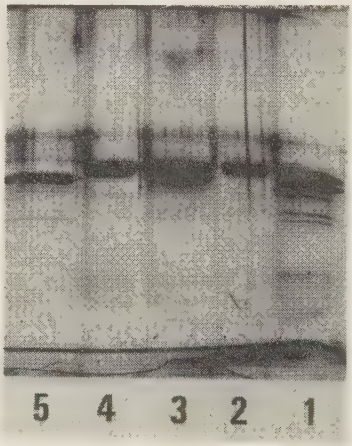



Abb. 25

Behandlung von gereinigter TAT mit alkalischer Phosphatase aus E. coli.
SDS-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (siehe Methoden).
1) TAT + AP, 30 min 37° C inkubiert;
2), 4) TAT, 30 min 37° C inkubiert;
3) wie 1), jedoch 30 min 0° C;
5) AP, 30 min 37° C inkubiert;
AP = alkalische Phosphatase aus E. coli.

Es war nach Phosphatasebehandlung kein Auftreten einer höhermolekularen Bande zu beobachten (Abb. 25). Das Ergebnis war zu erwarten, da Ladungsänderungen im Molekül durch das SDS abgefangen werden sollten.

## 5.4. Cyanbromidspaltung

Wie anfangs gezeigt werden konnte, präzipitiert das Anti-TAT-Serum aus einem 100 000 g Rattenleberüberstand mit $^{3}$H-Leucin markierten Proteinen (siehe Methodenteil) eine Bande, die im SDS-Gel genau in Position von gereinigter TAT läuft. Die Me-

thode der Wahl, um die $^{3}$H-"in vivo"-Bande, die $^{3}$H-"in vitro"-Bande und die gereinigte TAT-Untereinheit miteinander zu vergleichen, ist das Schneiden dieser Proteine mittels spezifischer Proteasen oder chemischer Agenzien und das Vergleichen der so entstandenen Peptide.

Da die höhermolekulare "in vitro" TAT-Untereinheit mengenmäßig sehr gering ist und nur im SDS-Gel über das Autoradiogramm nachzuweisen ist, wurde nach einer spezifischen Spaltung gesucht, die nur wenige Schnitte setzt, um die Radioaktivität in den erhaltenen Peptiden im Autoradiogramm noch nachzuweisen.

Hier bot sich die methioninspezifische Cyanbromidspaltung an, da VALERIOTE et al. (32) zeigen konnten, daß in der TAT-Untereinheit nur 12 Methioninmoleküle vorhanden sind. Maximal wären also 13 Peptide zu erwarten.

Versuchsdurchführung:

| $^{3}$H-TAT "in vitro" (Weizenkeimenzym) | $^{3}$H-TAT "in vivo" ($^{3}$H-Leberüberstand) | TAT isoliert aus Rattenleber |
|---|---|---|
| A | B | C |
| mit Anti-TAT-Serum präzipitiert aus einem 1000 µl Weizenkeimsynthese-ansatz | mit Anti-TAT-Serum präzipitiert aus 1000 µl 100000 g $^{3}$H-Leberüberstand | |
| SDS-Gelelektrophorese des aufgeschlossenen Präzipitats | | SDS-Gelelektrophorese von 40 µg gereinigter TAT |

Coomassie Färbung der Proteinbanden

| A | B | C |
|---|---|---|
| Ausschneiden eines Gelscheibchens 4 mm höher als die Bande in C | Ausschneiden eines Gelscheibschens in Höhe der Bande in C | Ausschneiden der Coomassie-gefärbten Bande |

Die ausgeschnittenen Gelscheibchen wurden in Eppendorfgefäßen mit einem Skalpell zerkleinert und im Lyophylisator getrocknet. Dazu gab man 300 µl einer 70%igen Ameisensäure mit 5 mg/ml Cyanbromid und inkubierte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Proben wurden lyophylisiert, mit 300 µl $H_2O$ versetzt, 30 min geschüttelt und erneut lyophylisiert. Dieses Waschen mit $H_2O$ wurde so oft wiederholt, bis ein pH von 6 erreicht war. Aufgeschlossen wurden die lyophylisierten Proben mit 200 µl Puffer wie unter Methoden beschrieben und die SDS-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (33) durchgeführt, wobei die Gelstückchen in größere Sammelgeltaschen eingefüllt wurden.

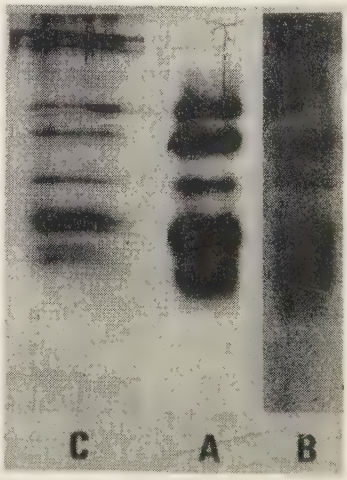



Abb. 26

Autoradiogramm der cyanbromidbehandelten "in vitro" (A) und "in vivo" (B) synthetisierten TAT-Untereinheiten. SDS-Gel 20%ig. Belichtungszeit des Autoradiogramms: 6 Wochen. Cyanbromidpeptide von gereinigter TAT (C).

Weitere Einzelheiten siehe Text.

Das Ergebnis in Abb. 26 zeigt eindeutige Größenhomologie der durch Cyanbromidbehandlung erhaltenen Peptide. Damit ist sichergestellt, daß alle drei untersuchten TAT-Untereinheiten Sequenzhomologien betreffs ihrer Cyanbromidschnittstellen haben und insofern identisch sind. Die radioaktiven Banden der CNBr-behandelten "in vitro"-TAT-Untereinheit sind sehr schwach, das kann jedoch an der Unsicherheit des Gelausschneidens liegen, da in diesem Falle keine Orientierungshilfe wie bei B durch C gegeben ist.

## 5.5 Diskussion

Tyrosinaminotransferase wird im Weizenkeim- und im Retikulozytensystem mit einer höhermolekularen Untereinheit synthetisiert. Zur Abklärung dieser Aussage waren weitere Versuche notwendig. Es konnte bereits gezeigt werden, daß das verwendete Antiserum spezifisch ist, 2 µl des Serums inaktivieren hundertprozentig bis zu 3 µg TAT (2.7). Eine aus Weizenkeimsystem mit Anti-TAT-γ-Globulin von der Arbeitsgruppe ROEWEKAMP präzipitierte TAT läuft im SDS-Gel in der gleichen höhermolekularen Form (Abb. 22). Wichtig ist hier der Hinweis, daß das Enzym zur Immunisierung der Kaninchen durch eine andere Reinigungsmethode (13) gewonnen wurde. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die TAT-Präparation durch die in dieser Arbeit beschriebene Reinigungsmethode eine eventuelle Modifikation während der Reinigung erfahren hat. Beide Reinigungsmethoden ergeben den gleichen spezifischen Antikörper. Auffallend ist weiterhin, daß das Autoradiogramm (Abb. 22) weitere kleine Banden aufweist, die alle niedermolekularer als die TAT-Bande

sind. Das Antiserum enthält im Gegensatz zu einer reinen γ-Globulinfraktion proteolytische Aktivitäten. Da höhermolekulare Banden wie die der TAT nicht auftreten, scheint es sich bei den niedermolekularen Banden um TAT-Peptide zu handeln, die durch einen frühzeitigen Kettenabbruch während der Synthese entstehen können. Möglich ist, daß solche unfertigen Proteinketten von den Proteasen leicht angegriffen werden.. Dies mag der Grund für das vermehrte Auftreten niedermolekularer Peptide bei Anwendung des γ-Globulins sein. Versuche mit Antiserum, welches mit gereinigtem Enzym an Anti-TAT-γ-Globulin verarmt wurde, zeigen eine verminderte Radioaktivität in der TAT-Bande. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die höhermolekulare Bande anti-TAT-γ-Globulin-spezifisch ist. Allerdings kann mit diesen Versuchen eine Kreuzreaktivität mit einem anderen Leberprodukt nicht ausgeschlossen werden.

Eine methioninspezifische Cyanbromidspaltung der TAT-Untereinheiten "in vivo","in vitro" und von gereinigter TAT und ein Vergleich der entstehenden Peptide zeigt, daß sich alle drei Peptidmuster gleichen. Diese Sequenzhomologie betreffs der Methioninpositionen in der Proteinkette zeigt, daß auch die höhermolekulare Untereinheit ein Produkt der TAT-mRNA ist. Das höhere Molekulargewicht der Untereinheit läßt mindestens eine weitere Bande im Peptidmuster erwarten. Leider kann dazu aufgrund des schwachen Autoradiogramms keine Aussage gemacht werden. Das erhöhte Molekulargewicht der Untereinheit dürfte bei 55 000 Dalton liegen. Ist das zusätzliche Proteinstück reich an Methionin, dann wäre es im Gel nicht nachzuweisen,

es sei denn, durch eine radioaktive Bande, welche an der Front läuft.

Umwandlungsversuche der höhermolekularen Untereinheit in die "in vivo"-Untereinheit mittels Leberhomogenat bleiben ohne Aussage, da das benutzte System wahrscheinlich zu reich an Proteasen ist. Ob die zellfreien Systeme in der Lage sind, die synthetisierten Untereinheiten analog der in vivo-Untereinheit zu phosphorylieren, ist nicht bekannt. Unterschiede im Laufverhalten in der SDS-Gelelektrophorese der mit alkalischer Phosphatase behandelten TAT aus Rattenleber konnten nicht festgestellt werden.

Man kann nun darüber spekulieren, ob die in vitro synthetisierte höhermolekulare Untereinheit auch in vivo auftritt oder ob dieses nur ein "in vitro"-Phänomen ist. Tatsache ist, daß bei der Immunopräzipitation aus einem $^{3}$H-Leucin markierten 100 000 g-Rattenleberüberstand nur eine Untereinheit mit dem Molekulargewicht von 50 000 Dalton nachzuweisen ist (siehe auch Abb. 17 B). Falls diese höhermolekulare Vorstufe in der Leber existent wäre, würde dieses Ergebnis nur so zu deuten sein, daß diese Vorstufe direkt nach der Translation von einer Protease "zurechtgeschnitten" wird. Bis dato sind solche Vorstufen nur von Zellproteinen bekannt, die sezerniert werden, wie z. B. Albumin.

Daß das Auftreten einer höhermolekularen Untereinheit ein Effekt der zellfreien Biosynthese ist, ist wahrscheinlicher. HUISMAN et al. (34) machten kürzlich eine ähnliche Beobachtung. Bei der zellfreien Biosynthese von Chloroplast-Ferrodoxin im Weizenkeimsystem wurde ein ebenfalls um 3 500 Dalton höheres

Produkt gefunden, das als echte biosynthetische Vorstufe interpretiert wurde. Der Beweis dafür ist noch nicht erbracht.

## 6. TAT- UND TO-mRNA-GEHALT BEI SUBSTRATINDUKTION

In normalen Ratten kann die TAT- und TO-Enzymaktivität durch das Substrat induziert werden (1). Im adrenalektomierten Tier kann die TAT durch ihr Substrat, das Tyrosin, nicht mehr induziert werden (10), während TO durch Tryptophan auch hier stimulierbar ist ( 2 ).

Die TAT benötigt für ihre Substratinduktion geringe Dosen von Glucocorticoiden (10), die für die TO-Substratinduktion offensichtlich nicht notwendig sind ( 2 ). Die Induktion von TO im adrenalektomierten Tier mit Hydrocortison und Tryptophan gleichzeitig ist additiv, die Enzymaktivität ist gleich der Summe der Enzymaktivitäten bei Einzelinduktionen mit Substrat oder Hormon gleichzeitig ( 2 ). Das selbe Experiment bei TAT mit Hydrocortison und Tyrosin zeigt ein anderes Ergebnis. Hier ist die Summe der Enzymaktivitäten bei Einzelinduktion mit Tyrosin und Hydrocortison wesentlich niedriger als bei Induktion mit Hormon und Substrat gleichzeitig (10).

Tryptophan induziert auch die TAT in normalen wie auch in adrenalektomierten Tieren, wenn auch bei letzteren nur geringfügig (10), während Tyrosin die Induktion der TO nicht beeinflußt (35).

Es scheinen hier also zwei verschiedene Mechanismen vorzuliegen. Tyrosin scheint bei Anwesenheit von Glucocorticoid spezifisch TAT zu induzieren, während Tryptophan beide Enzymaktivitäten steigert. Nachfolgende Untersuchungen über den TAT- und TO-mRNA-Gehalt bei Substratinduktion sollten zur Aufklärung der Mechanismen beitragen.

## 6.1 Experimentelle Durchführung

Adrenalektomierte Ratten erhielten die folgenden Dosen intraperitoneal und wurden nach 6 Stunden getötet:

| | | |
|---|---|---|
| Hydrocortisonacetat | 50 mg/kg | oder |
| L-Tyrosin | 600 mg/kg | oder |
| L-Tryptophan | 800 mg/kg | oder |
| 0,9 % NaCl | 15 ml/kg | |

Außerdem wurde das Hormon mit Tyrosin oder Tryptophan in zwei weiteren Gruppen kombiniert.

Die schnell herauspräparierten Lebern wurden dreigeteilt, dabei wurden 0,3 - 0,4 g für die TO-Bestimmung; 0,5 - 1 g für die TAT-Bestimmung und 3 - 4 g für die mRNA-Isolierung abgewogen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Leberstückchen für die Enzymaktivitätsbestimmungen wurden bei -20° C, für die mRNA-Isolierung bei -80° C aufbewahrt.

Die isolierte poly-A-haltige mRNA wurde in 400 µl Weizenkeimsystem-Ansätzen in Eppendorfgefäßen zur Translation gebracht. Jeweils 12 Translationen wurden auf einmal durchgeführt.

| Ansatz: | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Energiesystem | | 240 µl | In ein 30 ml-Corex-Glas, in dem zuvor 7,9 mCi $^3$H-Leucin mit 48 Ci/mMol lyophylisiert wurden. |
| | 18 Aminosäuren | 5 mM | 48 µl | |
| | L-Methionin | 5 mM | 48 µl | |
| | DTE | 200 mM | 48 µl | |
| | $K^+$-acetat | 4 M | 39 µl | |
| | Spermidin | 24 mM | 96 µl | |
| | Weizenkeimsystem | | 1920 µl | |
| | $H_2O$ | | 2121 µl | |
| | | | 4560 µl = 12 Ansätze a 380 µl | |

Jeweils 380 µl wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, indem die entsprechende Menge mRNA und bidestilliertes Wasser, insgesamt 20 µl, vorlagen. Es wurde mit einer mRNA-Konzentration von 20 OD/ml Syntheseansatz gearbeitet. Translation: 60 min,

30° C. Die Translation wurde im Eisbad gestoppt, jeder Syntheseansatz in ein Beckman Polycarbonat-Röhrchen überführt und 5 µl zur Bestimmung des Gesamteinbaus abgenommen. Dazu gab man 200 µl eines induzierten 100 000 g-Leberüberstandes als Carrier (siehe Methoden) und 2 ml eines Tris-HCl-Puffers, 20 mM, 140 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Natriumdesoxycholat, 1 % L-Leucin, 10 mM L-Tryptophan (pH 7,5). Zentrifugation im Beckman Rotor Ti 50, 50 000 rpm, 60 min.

Jeder Überstand wird in ein vortariertes Reagenzglas gegeben. Nach gutem Schütteln (es hat sich während der Zentrifugation ein Gradient ausgebildet) werden weitere 5 µl zur Bestimmung des löslichen Gesamteinbaus abgenommen (siehe Methoden) und 1,3 ml in ein anderes Reagenzglas gegeben. Der verbleibende Rest wird zurückgewogen und notiert, damit man später auf den gesamten löslichen Einbau beziehen kann. Ein Teil wird mit 5 µl Anti-TO-γ-Globulin, der andere Teil mit 10 µl Anti-TAT-Serum über Nacht bei 4° C präzipitiert.

Das Präzipitat wurde wie im Methodenteil beschrieben gesammelt, gewaschen, aufgeschlossen und im SDS-Gel nach LAEMMLI aufgetrennt. Das behandelte Gel wird autoradiographiert und der Röntgenfilm nach zwei Tagen entwickelt. Das Röntgenbild wird auf das Plattengel aufgelegt, die Lage der radioaktiven Bande mittels Nadelstichen markiert, ausgeschnitten und gezählt (siehe Methoden). Die ermittelte Radioaktivität in der Bande wird auf den löslichen Gesamteinbau bezogen. In Tab. 3 ist ein typisches Experiment zusammengefaßt.

| Behandlung | Gesamteinbau cpm/5 µl Syntheseansatz | pMole Leucin pro 50 µl Syntheseansatz (Gesamteinbau) | löslicher Gesamteinbau cpm/5 µl (nach Zentrifugation) | pMole Leucin-Einbau pro 50 µl Syntheseansatz (löslicher Einbau) | dpm x $10^{-2}$ in 1,3 ml des löslichen Überstandes |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Tryptophan 800 mg/kg 6 h | 571753 | 167 | 48717 | 92 | 39,397 |
| | 528116 | 154 | 42443 | 80 | 34,319 |
| | 611862 | 178 | 48953 | 93 | 39,583 |
| | 538550 | 157 | 43880 | 83 | 35,481 |
| | 523250 | 152 | 42743 | 81 | 34,562 |
| | 607634 | 177 | 44811 | 85 | 36,234 |
| | 577434 | 168 | 43432 | 82 | 35,119 |
| 0,9 % NaCl 6 h | 402140 | 117 | 33111 | 63 | 26,774 |
| | 415795 | 121 | 32224 | 61 | 26,056 |
| | 419769 | 122 | 34066 | 65 | 27,546 |
| | 323962 | 95 | 23739 | 45 | 19,135 |

Tab. 3 Beispiel eines typischen Translationsexperiments.

In (1) sind die cpm aus 5 µl Syntheseansatz angegeben. Sie wurden direkt nach der Translation entnommen und die Radioaktivität mit der Filtertechnik, wie sie in Methoden beschrieben ist, bestimmt. Diese cpm sind ein Maß für den Gesamteinbau des Systems und geben die Einbaufähigkeit der eingesetzten mRNA wieder. Aus diesem Wert kann der Gesamteinbau in pMolen Leucin pro 50 µl Syntheseansatz ermittelt werden (2). Alle hier folgenden Berechnungsbeispiele beziehen sich auf die erste Zeile.
In 5 µl Syntheseansatz sind 571753 cpm eingebaut,
in 50 µl " " 5717530 " " .

| cpm im Gel, TAT | dpm/$10^6$ löslich, TAT | verbleibende µl für TO-Präzipitation | dpm x $10^{-6}$ in den verbleibenden µl für die TO-Präzipitation | cpm in Gel, TO | dpm/$10^6$ dpm löslich, TO | Mittelwert und Standardabweichung TAT | Mittelwert und Standardabweichung TO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 2602 | 264 | 1220 | 36,968 | 370 | 40 | 377 ± 101 | 46 ± 9 |
| 2733 | 319 | 1260 | 33,263 | 415 | 50 | | |
| 2976 | 301 | 1260 | 38,365 | 444 | 46 | | |
| 3237 | 365 | 1230 | 33,571 | 284 | 34 | | |
| 3320 | 384 | 1230 | 32,701 | 354 | 43 | | |
| 4053 | 447 | 1230 | 34,283 | 447 | 52 | | |
| 4926 | 561 | 1190 | 32,147 | 480 | 60 | | |
| 651 | 97 | 1180 | 24,302 | 265 | 44 | 99 ± 15 | 50 ± 21 |
| 779 | 120 | 1190 | 23,852 | 479 | 80 | | |
| 593 | 86 | 1190 | 25,125 | 288 | 46 | | |
| 440 | 92 | 1290 | 19,048 | 145 | 30 | | |

Unter Berücksichtigung der Zählausbeute ergeben sich für 50 µl 17781518 dpm. Im Gesamtansatz waren 3,9 ml $^3$H-Leucin (48 Ci/mMol und 1 mCi/ml) eingesetzt (lyophylisiert). Das sind 20,833 µMol/Ci oder 20,833 nMole/mCi. Da die Lösung 1 mCi/ml hat und 3,9 ml eingesetzt wurden, ergeben sich total 81,2498 nMole oder 81249,8 pMole.
Da kein kaltes Leucin im Ansatz vorhanden war, ist dies die Endkonzentration im Gesamtansatz von 12 x 400 µl = 4,8 ml. Daraus ergeben sich 846 pMole Leucin/50 µl Syntheseansatz.

Insgesamt wurden 3,9 mCi eingesetzt, das sind 40,625 µCi/50 µl Syntheseansatz oder 90,1875 x $10^6$ dpm/50 µl. Hierbei wurde der übliche Umrechnungsfaktor von Ci in dpm benutzt.(36).

Aus diesen Werten ergibt sich ein Faktor für die Einbauberechnung von 106605 dpm/pMol Leucin. Somit ergibt sich für 17781512

dpm eine Einbaurate von 167 pMolen Leucin/50 µl.
Nach Abzentrifugation der Polysomen wurden weitere 5 µl entnommen und die enthaltene Radioaktivität bestimmt (3);unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren kann auch hier wieder Einbau bestimmt werden (4). Hierbei handelt es sich um den löslichen Einbau, da die Polysomen mit den anhaftenden nascenten Ketten sedimentiert sind. In Spalte (5) ist die Gesamtradioaktivität in dpm x $10^{-6}$ angegeben, die in lösliches Protein eingebaut ist. Nach dem Abzentrifugieren wird das theoretische Gesamtvolumen von 2,6 ml geteilt. 1,3 ml werden für die TAT-Präzipitation eingesetzt, der Rest abgewogen und daraus die TO präzipitiert. Aus dem Wert in Spalte (3) werden entsprechend der Volumina der lösliche Einbau in (5) und (9) berechnet.
In Spalte (6) sind die ermittelten cpm aus den ausgeschnittenen Gelscheibchen aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Zählausbeute von 20 % (siehe Methodenteil) wird die spezifische Radioaktivität der TAT- und TO-Gelscheibchen auf $10^6$ dpm löslichen Gesamteinbau bezogen (Spalte 7 und 11). Dadurch werden Schwankungen bei der Anwendung unterschiedlicher Weizenkeimpräparationen und unterschiedlicher mRNA-Präparationen berücksichtigt. In den Spalten (12) und (13) sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

## 6.2. Ergebnisse

Das Ergebnis der Bestimmung der relativen TAT- und TO-mRNA-Konzentrationen bzw. TAT- und TO-Aktivitäten bei Substratinduktion ist in Tab. 4 zusammengefaßt. Zum besseren Vergleich sind die Daten außerdem graphisch in Abb. 27 und 28 zusammengefaßt. Die Enzymaktivitäten zeigen die erwarteten Ergebnisse: Tyrosin stimuliert im adrenalektomierten Tier keine der beiden Enzyme, Tryptophan wirkt hier nur bei der TO. Hydrocortison alleine stimuliert beide Enzyme. Die Kombination von Hormon und Tryptophan zeigt bei beiden Enzymaktivitäten einen additiven Effekt, d. h., die Summe der Einzelinduktions-Aktivitäten ist gleich der Enzymaktivität, die man bei gleichzeitiger Gabe des Hormons und des Tryptophans erhält. Ein völlig anderes Bild ergibt sich bei der kombinierten Hydrocortison-Tyrosin-Induktion. Das Substrat erhöht hier den Hormoneffekt auf mehr als das Doppelte. Bei der Tryptophanoxygenase bleibt der Effekt

| Behandlung | Tyrosinaminotransferase | | | Tryptophanoxygenase | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Enzym-aktivität U/g Leber | Relative mRNA-Aktivität dpm/$10^6$ dpm löslich eingebaut | mRNA-Anstieg x-fach gegenüber dem Blindwert (0,9 % NaCl) | Enzym-aktivität µMole Kynurenin $g^{-1}$ $h^{-1}$ | Relative mRNA-mRNA-Aktivität dpm/$10^6$ dpm löslich eingebaut | mRNA-Anstieg x-fach gegenüber dem Blindwert (0,9 % NaCl) |
| 0,9 % NaCl | 2,7 ± 0,9 | 99 ± 15 | | 3,6 ± 0,5 | 50 ± 21 | |
| Tyrosin 600 mg/kg | 2,9 ± 0,9 | 74 ± 32 | 1 | 3,5 ± 0,8 | 45 ± 11 | 1 |
| Tryptophan 800 mg/kg | 7,0 ± 2,0 | 377 ± 101 | 3 - 4 | 6,7 ± 3,4 | 46 ± 9 | 1 |
| Hydrocortison 50 mg/kg | 25,6 ± 12,6 | 245 ± 149 | 2 - 3 | 14,1 ± 4,0 | 258 ± 37 | 4 - 6 |
| Hydrocortison + Tyrosin | 59,9 ± 10,8 | 889 ± 280 | 6 - 10 | 14,7 ± 5,0 | 298 ± 61 | 4 - 6 |
| Hydrocortison + Tryptophan | 33,2 ± 7,1 | 502 ± 91 | 4 - 6 | 23,7 ± 4,9 | 238 ± 62 | 4 - 6 |

Tab. 4 TAT- und TO-Aktivitäten und relative TAT- und TO-mRNA-Aktivitäten bei Substratinduktion.

völlig aus, bei kombinierter Tyrosin-Hydrocortison-Induktion ist der TO-Aktivitätswert der gleiche wie bei alleiniger Hormonstimulation. Diese Ergebnisse sind schon mehrfach publiziert worden (10, 22, 35).

In Abb. 27 und 28 sind ebenfalls die relativen TAT- und TO-mRNA-Aktivitäten, welche ein Maß für die mRNA-Konzentration ergeben, graphisch dargestellt. Die TAT-mRNA kann im adrenalektomierten Tier durch Tyrosin nicht erhöht werden. Überraschend ist das Ergebnis, daß Tryptophan hier eine gleich hohe mRNA-Steigerung wie bei der Hydrocortisoninduktion ermöglicht. Das Tryptophan in der Lage ist, den Gehalt an TAT-mRNA zu erhöhen, zeigt auch das Ergebnis bei der kombinierten Induktion mit Hydrocortison zusammen. Der mRNA-Gehalt liegt hier deutlich höher als der bei Hydrocortison ermittelte. Der höchste mRNA-Gehalt wurde bei der kombinierten Hydrocortison-Tyrosin-Induktion gefunden. Dies ist erstaunlich, zumal Tyrosin alleine die mRNA-Konzentration nicht erhöht. Der ermittelte Wert liegt 2 - 3mal über der TAT-mRNA-Konzentration bei Hormoninduktion.

Bei der Tryptophanoxygenase ist das Bild ein anderes. Beide Aminosäuren können im adrenalektomierten Tier die TO-mRNA-Konzentration nicht erhöhen. Hydrocortison erhöht den TO-mRNA-Spiegel auf das 4 - 6fache gegenüber den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tieren. Eine weitere Erhöhung durch kombinierte Induktion war nicht möglich.

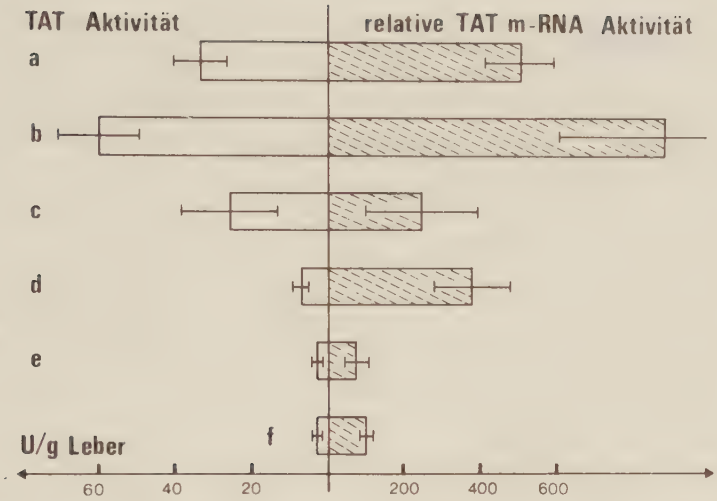
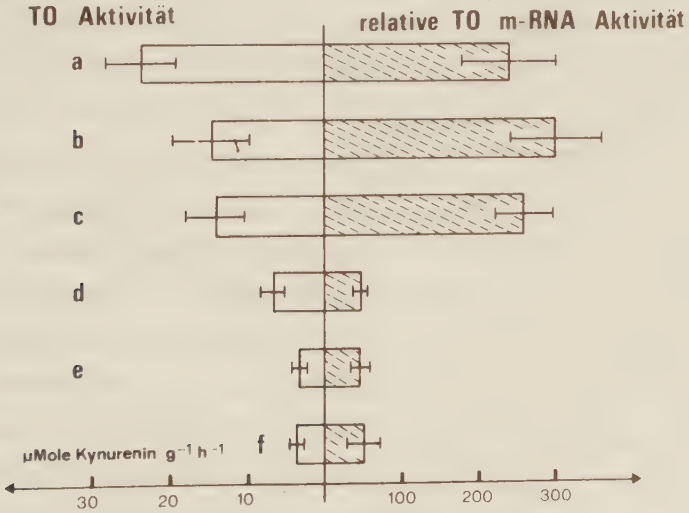



Abb. 27 und 28: TAT- und TO-Aktivitäten und relative TAT- und TO-mRNA-Konzentrationen bei Substratinduktion.
Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Einzelergebnissen von 4 - 9 Tieren pro Gruppe gebildet.
Induktionen mit a) Hydrocortison + Try; b) Hydrocortison + Tyr; c) Hydrocortison; d) Tryptophan; e) Tyrosin; f) physiol. Kochsalzlösung. Die Dosen sind im Text angegeben.
Induktionszeit: 6 Stunden.



## 6.3. Diskussion

Die Enzyminduktion der TAT und TO durch Hydrocortison ist mit einem Anstieg der TAT- und TO-mRNA-Konzentration verbunden. Das konnte schon von ROEWEKAMP et al. (4) für die TAT und von SCHÜTZ et al. (3) für die TO nachgewiesen werden.
Tyrosin allein kann im adrenalektomierten Tier keine TAT induzieren, so bleibt auch der TAT-mRNA-Spiegel gegenüber den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrolltieren gleich. Erst bei gleichzeitiger Anwesenheit des Hydrocortisons steigt die TAT-mRNA-Konzentration stark an. Interessant dabei ist, daß die mRNA-Konzentration zwei- bis dreimal höher ist als die bei Hormoninduktion ermittelte. Da jedoch Tyrosin alleine keinerlei Einfluß auf den TAT-mRNA-Spiegel hat, muß das Tyrosin mit dem Hydrocortison synergistisch wirken. Es bleibt nun die Frage offen, wo das Substrat der TAT seinen eigentlichen Angriffspunkt hat. KRÖGER et al. (37) konnten zeigen, daß Tyrosin in Verbindung mit geringen Hormondosen, welche alleine keinerlei TAT-Induktion hervorrufen, die TAT stimuliert. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Actinomycin D ist diese Stimulation vollständig gehemmt. Die Tyrosinwirkung scheint mit der Neusynthese von mRNA verknüpft zu sein. Man kann nun an einem von TOMKINS et al. (38) aufgestellten Modell spekulieren. Das Hydrocortison stimuliert die Synthese von TAT-mRNA und die Synthese eines Repressors, welcher die Translation der TAT-mRNA hemmt, bzw. den Abbau der TAT-mRNA stimuliert. Postuliert man nun eine Repressor-Tyrosin-Interaktion, die die Repressorwirkung aufhebt, so käme es zu einer Stimulation der TAT-mRNA-Translation. Da das Actinomycin D jedoch die Tyrosinwirkung

hemmt, wäre die Wirkungsart des Repressors an der DNA zu suchen. Es kann dies jedoch keine Alles- oder Nichts-Reaktion sein, da hohe Hormondosen allein das Enzym stimulieren. Der Befund von HOFER et al. (15) favorisiert dieses Modell. Cycloheximid, ein Translationsblocker, akkumuliert unter Hydrocortisoneinfluß den TAT-Messenger. Das könnte bedeuten, daß das Cycloheximid die Synthese des Repressors, der allerdings einen hohen Turnover haben müßte, hemmt und dadurch der Abbau von mRNA wie nach TOMKINS beschrieben gestoppt ist.

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis ist die Erhöhung der TAT-mRNA-Konzentration nach Tryptophaneinwirkung im adrenalektomierten Tier. Der Anstieg des TAT-mRNA-Spiegels ist mit dem Anstieg bei Hydrocortisoninduktion vergleichbar. Der Effekt bei gleichzeitiger Stimulation von Hormon und Tryptophan auf die TAT-mRNA-Konzentration ist additiv. Auffallend ist der relativ hohe TAT-mRNA-Anstieg gegenüber dem Enzymaktivitätsanstieg. Ein Hemmer der Proteinbiosynthese, das Puromycin, inhibiert die tryptophanabhängige TAT-Aktivitätssteigerung vollständig (35). Es ist nun die Frage, ob diese Aminosäure eine Neusynthese von TAT-mRNA stimuliert oder den mRNA-Abbau hemmt. Hier muß erwähnt werden, daß das Tryptophan wohl die TO-Aktivität stimuliert, aber keinerlei TO-mRNA-Konzentrationserhöhung auftritt. Inwieweit ist als die Tryptophanwirkung TAT-spezifisch? Mit einem Transkriptionsblocker wie α-Amanitin oder Actinomycin D müßte abgeklärt werden inwieweit die Tryptophanwirkung auf eine Erhöhung der Transkription bzw. eine Hemmung des TAT-mRNA-Abbaus zurückzuführen ist. Bei einer Tryptophan-induzierten TO-Aktivitätssteigerung ist keine Erhöhung

der TO-mRNA-Konzentration festzustellen. Untersuchungen von GREENGARD et al. (39) zeigten, daß das Tryptophan die Tryptophanoxygenase durch die Freisetzung von Eisenporphyrin aus Lebermikrosomen stimuliert und stabilisiert. Tryptophan zeigt also bei der Stimulierung beider Enzyme einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus: Bei der TAT steigt die aktuelle TAT-mRNA-Konzentration und die TAT-Aktivität, bei der TO wird das Enzym aktiviert und stabilisiert. Ein weiterer TAT-Induktionsversuch zeigte nach 4 Stunden Induktionszeit das gleiche Ergebnis, nur die relativen TAT-mRNA-Aktivitäten lagen entsprechend niedriger, da das Maximum für die Hydrocortisoninduktion (4), für die Tyrosin/Hydrocortison-Induktion (1) und für die Tryptophan/Hydrocortisoninduktion (40) bei 6 Stunden liegt.

# 7. MATERIAL UND METHODEN

## 7.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität

| Verbindung | Firma |
|---|---|
| Acrylamid | Bio-Rad |
| AH-Sepharose 4B | Pharmacia |
| Coomassie Brilliant Blau | Schwarz/Mann. |
| Freund'sches Adjuvans | Difco |
| Hydrocortisonacetat | Sigma |
| Nuclease aus Staphyloccoccus aureus | Boehringer |
| Oligo dT-Cellulose | Collab. Res. Inc. |
| Phenylhydrazin | Ferak |
| Weizenkeime | GEG Mannheim |
| Ammoniumpersulfat | Serva |
| Bromphenolblau | " |
| Heparin | " |
| Kreatinphosphat, Na Salz | " |
| Kreatinphosphokinase | " |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | " |
| N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin | " |
| Phenylmethan sulfonylfluorid | " |
| SDS | " |
| Spermin x 4 HCl | " |
| Triton X-100 | " |

| | |
|---|---|
| Pyridoxamin-5'-phosphat | Merck |
| Pyridoxal-5'-phosphat | " |
| Natriumdesoxycholat | " |
| Bis-(aminoäthyl)-glycoläther N,N,N',N'-tetraessigsäure | " |
| N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid | " |

## 7.2. Methoden

### 7.2.1 Behandlung und Haltung der Ratten:

130 - 150 g schwere männliche Wistar Ratten wurden für die Versuche verwendet. Falls nötig, wurden die Tiere unter Äthernarkose adrenalektomiert und fünf Tage nach der Operation dem Versuch zugeführt. Intakte Tiere erhielten Futter und Wasser, adrenalektomierte Tiere Futter und 0,9%ige Kochsalzlösung ad libitum.

### 7.2.2 Immunisierung der Kaninchen:

Kaninchen (3 - 5 Monate alt) wurden nach dem folgenden Schema immunisiert:

| Tag | Injektion | Injektionsort |
|---|---|---|
| 1 | 150 µl Enzym + 150 µl F.A. | Fußballen |
| | 500 µl F.A. | i.m. |
| 4 | 150 µl Enzym + 150 µl F.A. | Fußballen |
| 8 | 100 µl Enzym + 100 µl F.A. | i.c. |
| 15 | 100 µl Enzym + 100 µl F.A. | i.c. |
| 21 | 100 µl Enzym + 100 µl F.A. | i.c. |
| 25 | 100 µl Enzym + 100 µl F.A. | i.c. |
| 30 | 100 µl Enzym + 100 µl F.A. | Fußballen |
| 35 | Serum entnommen | |

Enzymlösung (ca. 0,5 µg/ml) und Freund'sches Adjuvans wurden vor der Injektion jeweils emulgiert, entblutet wurde mittels eines Schnittes an der Ohrvene (50-60 ml Blut/Kaninchen).

7.2.3 Erzeugung einer Anämie im Kaninchen (46):

2 - 3 g schwere Kaninchen erhielten täglich eine Injektion (300 µl/kg) von 2,5 % Phenylhydrazin in 150 mM Acetatpuffer (pH 7,0). Am 5. und 6. Tag stieg der Retikulozytengehalt auf 70 %. Einen Tag später wurde Blut aus der Ohrvene mittels eines Schnittes entnommen und in einem heparinisierten Gefäß aufgefangen.

7.2.4 Retikulozytenzählung:

In eine Leucozytenpipette wurde bis zur Marke 0,5 eine 1%ige Brilliantkresylblaulösung in physiologischer Kochsalzlösung aufgezogen und anschließend Blut aus dem Ohrläppchen des Kaninchens bis zur Marke 1 nachgezogen. Das Gemisch wurde in einen Objektträger mit Vertiefung eingeblasen, gemischt und 30 min in einer feuchten Kammer belassen. Ein luftgetrockneter Ausstrich von einem Tropfen dieses Gemisches wurde mit Ölimmersion ausgezählt. Der Retikulozytengehalt wurde in Promille angegeben.

7.2.5 Gewinnung der Antiseren und Isolierung von γ-Globulin aus dem Serum:

Das frisch aus der Ohrvene gewonnene Blut wurde eine halbe Stunde bei 37° C inkubiert, danach 20 min bei 1400 g abzentrifugiert und das Serum abgehebert. Die Seren lagerten bei -20°C. Aus dem Anti-TO-Serum wurde das γ-Globulin nach der von STELOS (41) beschriebenen Methode mit Ammoniumsulfat isoliert.

7.2.6 Bestimmung von Protein nach LOWRY et al. (42):

Reagenzien: Lösung A: 2 % $Na_2CO_3$

Lösung B: 1%ige $CuSO_4$-Lösung und
2 % Kalium-Natriumtartratlösung
1:1 gemischt.

Die zu bestimmenden Lösungen mit 5 - 50 mg Protein in Volumina bis zu 200 µl wurden mit 250 µl 25%iger TCA in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in der Kälte gefällt und 15 min bei 8000 g

in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Sediment mit 100 µl 1 N NaOH gelöst. 10 min nach Zusatz von 1 ml eines Gemisches aus A und B (50 : 1) wurden dann 100 µl einer 50%igen Folin-Ciocalteus Phenolreagenzlösung dazugegeben, gemischt und nach 30 min die OD bei 546 nm im Eppendorf Filterphotometer bestimmt. Parallel dazu wurde jeweils eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin als Standard erstellt. Die Extinktion war bis 50 µg Protein direkt proportional der Proteinmenge.

7.2.7 Aktivitätsbestimmung der Tryptophanoxygenase (43):

Reaktionspuffer I Kaliumphosphatpuffer 0,2 M, pH 7,2

II KCl 0,14 M

L-Tryptophan 3 mM, Hämoglobin vom Rind 677 mg/l im Gemisch aus I und II wie 2 : 1.

Zur Bestimmung der TO-Aktivität in der Leber wurden ca. 0,5 g mit 11,5 ml Reaktionslösung 30 sec im Ultra Turrax (Firma Janke und Kunkel) homogenisiert, mit 0,2 ml einer neutralisierten 0,4 M Ascorbinsäure versetzt und im Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert. Nach 20 und nach 50 min wurden jeweils 4 ml in ein Zentrifugenglas überführt und die Reaktion mit 0,4 ml 45 % Perchlorsäure gestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 5000 g) wurden in einem anderen Zentrifugenglas zu 3 ml des Überstandes 0,6 ml einer 3 M Kaliumbikarbonatlösung zugegeben, nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert und die OD 366 nm im Überstand bestimmt. Die TO-Aktivität in gebildeten µMolen Kynurenin pro Gramm und Stunde berechnet sich aus:

$$\text{Aktivität} = \frac{\text{OD} \times 7370}{\text{mg Leber.}}$$

7.2.8 Aktivitätsbestimmung der Tyrosinaminotransferase (44):

Zur TAT-Aktivitätsbestimmung in der Leber wurde Leber mit der Schere zuvor kleingeschnitten und in einem Phosphatpuffer 50 mM (pH 6,5), 2,5 mM α-Ketoglutarat 20 sec lang im Ultra Turrax der Firma Janke und Kunkel homogenisiert. Folgende

Lösungen wurden zum Ansatz benötigt:

α-Ketoglutarat 0,5 M, mit KOH auf pH 7 eingestellt,

Pyridoxal-5'-phosphat 5 mM, mit KOH auf pH 6,5 eingestellt,

Kaliumdihydrogenphosphat 0,125 M,

Verdünnungspuffer: Kaliumphosphatpuffer 0,125 M, pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTE und 5 mg Rinderserumalbumin/ml,

Tyrosinlösung: 381 mg L-Tyrosin in 192 ml $K_2HPO_4$ 0,125 M und 0,9 ml 10 N KOH.
Diese Lösung ist einen Monat lang haltbar bei 4° C.

Die eigentliche Reaktionslösung wurde kurz vor der Bestimmung angesetzt, weil das Tyrosin nach kurzer Zeit aus dieser Lösung auskristallisierte. Dazu wurde die Tyrosinlösung mit $KH_2PO_4$ 0,125 M auf pH 7,6 gebracht und zu 8 Teilen dieser Lösung 0,2 Teile der α-Ketoglutarat- und 0,1 Teile der Pyridoxal-5'-phosphatlösung gegeben.

830 µl dieser Reaktionslösung wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf 37° C gebracht und die Reaktion mit 100 µl der Probe gestartet. Proben mit hoher TAT-Aktivität wurden mit Verdünnungspuffer verdünnt. Der Blindwert enthält zum Zeitpunkt Null bereits 70 µl 10 N KOH. Nach 10 min wird die Reaktion durch Zugabe von 70 µl 10 N KOH gestoppt und zur Bildung des Aldehyds aus der p-Hydroxybrenztraubensäure weitere 30 min bei 37° C belassen. Aus der Differenz der $OD_{334\ nm}$ zwischen Blindwert und 10 Minutenwert kann die Aktivität der TAT mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Aktivität} = \frac{OD \times 0{,}0050025\ \mu\text{Mole}}{\text{min}}$$

Definitionsgemäß (44) ist hier eine Enzymeinheit (U = Unit) die Menge Enzym, welche 1 µMol p-Hydroxybrenztraubensäure pro min bei 37° C bildet. Die spezifische Aktivität wird in U/mg Protein angegeben.

7.2.9 TAT-Aktivitätsfärbung nach VALERIOTE et al. (32)

TAT-aktive Proteinbanden konnten in den Disk-Polyacrylamidgelen durch eine spezifische Farbreaktion nachgewiesen werden. Dazu wurden die Gele direkt nach der Elektrophorese für 5 - 10 min bei 37° C in ein Gemisch aus

| | | |
|---|---|---|
| 1 | ml | 0,2 mM Pyridoxal-5'-phosphat |
| 2 | ml | 0,5 M α-Ketoglutarat, pH 7 |
| 10 | ml | p-Jodnitrotetrazolumviolett 1 mg/ml |
| 2,5 | ml | Phenazinmethosulfat 0,4 mg/ml |
| 35 | ml | 20 mM Monojodtyrosin in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6 |

inkubiert. TAT-aktive Banden färben sich rotbraun.

7.2.10 Disk-Polyacrylamidgelelektrophorese nach MILLER et al. (21)

7%ige Trenngele wurden in Glasröhrchen (0,6 x 10 cm) 6 - 7 cm hoch aus folgendem Gemisch polymerisiert:

| | |
|---|---|
| 4 Teile | 3 M Tris-HCl Puffer (pH 8,8) 20 mM TEMED |
| 8 Teile | Acrylamidlösung 28 % mit 365 mg BIS/50 ml |
| 4 Teile | $H_2O$ dest. |
| 16 Teile | Ammoniumpersulfatlösung 14 %. |

Das Sammelgel wurde aus einem Gemisch aus

| | |
|---|---|
| 10 ml | 0,125 M Tris-$H_2SO_4$-Puffer, pH 6,8 mit 3 % Acrylamid und 800 mg BIS/100 ml |
| 5 µl | TEMED |
| 10 mg | Ammoniumpersulfat |

1,5 - 2 cm hoch auf das Trenngel aufpolymerisiert.

Alle Lösungen wurden zuvor im Wasserstrahlvakuum entgast. Die Proben enthielten bis zu 60 µg Protein in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,6), waren 15%ig an Saccharose und enthielten 5 µl 0,05-%iger Bromphenolblaulösung. Das Probenvolumen war nicht größer als 100 µl. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten

Stromstärke von 2,5 mA pro Röhrchen durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande den unteren Gelrand erreicht hat. Der Elektrophoresepuffer, ein 0,05 M Tris- 0,38 M Glycerin-Puffer (pH 8,3) mit 2 x $10^{-4}$ M Pyridoxal-5'-phosphat wurde in der oberen und unteren Elektrophoresekammer durch Gegenstromkühlung bei 18° C gehalten.

7.2.11 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese nach REISFELD et al. (19):

Die Lösungen für das Sammel- und Trenngel wurden in 10 M Harnstoff bereitet und in Glasröhrchen (0,6 x 10 cm) polymerisiert.

Trenngel:
- 1 Teil Acrylamidlösung 16%ig mit 0,8 % BIS
- 1 Teil 18,15 g Tris, 24 ml 1 N HCl und 240 µl TEMED auf 100 ml
- 2 Teile Ammoniumpersulfatlösung 0,14%ig

Trenngelhöhe: 7 cm

Sammelgel:
- 1 Teil Acrylamidlösung 8%ig mit 0,8 % BIS
- 1 Teil 2,23 g Tris, 12,8 ml 1 M $H_3PO_4$ und 100 µl TEMED auf 100 ml
- 2 Teile 1 mg Riboflavin, 40 mg Ammoniumpersulfat auf 100 ml

Sammelgelhöhe: 1,5 cm

Nach 30 min polymerisierte das Sammelgel unter einer UV-Lampe. Der obere Elektrodenpuffer (pH 8,9) setzte sich aus 5,16 g Tris, 3,48 g Glycerin und 700 ml 10 N Harnstoff pro Liter $H_2O$ dest. zusammen, der untere Elektrodenpuffer (pH 8,1) enthielt 14,6 g Tris und 60 ml 1 N HCl pro Liter $H_2O$ dest. Proteinbanden wurden mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

7.2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Molekulargewichtsbestimmung nach WEBER und OSBORN (20):

Alle Lösungen wurden zuvor im Wasserstrahlvakuum entgast. Rundgele goß man in Foto Flo behandelte Glasröhrchen (0,6 x 10 cm) aus folgendem Gemisch:

15 ml Phosphatpuffer aus 7,8 g $NaH_2PO_4$
38,6 g $Na_2HPO_4$ x 7 $H_2O$, 2 g SDS/Liter

13,5 ml Acrylamidlösung 22%ig mit 0,6 % BIS

1,5 ml Ammoniumpersulfatlösung 1,5%ig.

Proteine wurden nach dem folgenden Schema präpariert:

3 µl Bromphenolblau 0,05 %

15 µl Glycerin

5 µl ß-Mercaptoäthanol

50 µl Proteinlösung (20 - 50 µg)

50 µl 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)
1 % SDS, 1 % ß-Mercapthoäthanol.

Aufgeschlossen wurde über Nacht bei 37° C und vor dem Auftragen 5 min bei 95° C. Die Elektrophorese lief 4 - 5 Stunden in einem Gelpuffer, hergestellt aus Phosphatpuffer (s. oben) 1 : 1 verdünnt, mit einer konstanten Stromstärke von 8 mA/Röhrchen, bis die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte. Proteinbanden wurden mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes ließ man Eichproteine in separaten Gelen laufen und berechnete deren Mobilitäten zu:

$$\text{Mobilität} = \frac{\text{Wanderungslänge Protein}}{\text{Gellänge nach Entfärbung}} \times \frac{\text{Gellänge zur Entfärbung}}{\text{Wanderungslänge Bromphenolblau}}$$

Man erstellt aus den Mobilitäten und den dazu gehörigen Molekulargewichten der Untereinheiten auf halblogarithmischem Papier eine Eichgerade und konnte damit aus der Mobilität des unbekannten Proteins das Molekulargewicht seiner Untereinheit ablesen.

7.2.13 Disk-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach LAEMMLI (33):

Die Elektrophoresen wurden in Flachgelen durchgeführt, so konnten bis zu 8 Proben direkt miteinander verglichen werden. Zudem konnten die Gele leicht autoradiographiert werden. 2 Glasplatten (8,2 x 11,4 cm) wurden über 2 Plexiglasstäbe (2 mm) am Längsrand mit Klebeband verklebt und abgedichtet. Die so präparierten Platten wurden in einer Petrischale in 10%igem Trenngel (siehe unten) ca. 0,5 cm hoch eingegossen. Nach dem Erhärten wurden Gele aus folgenden Lösungen gegossen:

Trenngel 10 % : 10 ml Tris-HCl-Puffer, 1,5 M (pH 8,8)
13,3 ml einer Lösung aus 30 g Acrylamid und 0,8 g BIS/100 ml $H_2O$
20 µl TEMED
0,4 ml SDS 10%ig
16,3 ml $H_2O$ dest.

Polymerisieren durch Zugabe von 100 µl frisch zubereiteter 10%iger Ammoniumpersulfatlösung

Sammelgel 3 % : 2,5 ml Tris-HCl-Puffer 0,5 M (pH 6,8)
1,0 ml Acrylamidlösung wie oben
20 µl TEMED
0,1 ml SDS 10%ig
6,4 ml $H_2O$ dest.

Polymerisieren durch Zugabe von 50 µl frisch zubereiteter 10%iger Ammoniumpersulfatlösung.

Trenngelhöhe: 7 - 8 cm. Sofort nach dem Gießen des Trenngels wurde vorsichtig mit 200 µl $H_2O$ dest. überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach beendeter Polymerisation, die durch die Bildung einer scharfen Trennlinie zwischen Gel und Wasser zu erkennen ist, wurde das Wasser abgegossen, die Platte in die Halterung der Elektrophoreseeinrichtung (Pharmacia) eingespannt und durch die Lücken des eingeschobenen Plexiglaskammes mit Hilfe einer 1 ml Eppendorf-Pipette die Sammelgellösung eingefüllt. Nach 20 - 30 min wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die gebildeten Geltaschen mit einem feuchten dünnen Glasstab wieder in Position gebracht. Jede Geltasche wurde mit 50 µl Elektrodenpuffer (Tris 25 mM,

Glycin 0,192 M, 0,1 % SDS, pH 8,3) aufgefüllt und mit der aufgeschlossenen Probe unterschichtet. Der Aufschluß der Proben (Antigen-Antikörper-Präzipitat) geschieht folgendermaßen: Probe mit 50 µl 50 mM Trispuffer (pH 6,8) mit 10 % Glycerin, 0,2 % SDS, 3 % ß-Mercaptoäthanol, 1 ‰ Bromphenolblau, 30 min im Eppendorf-Schüttler durchmischen, über Nacht bei 37° C und vor dem Auftragen 5 min bei 95° C inkubieren. Beide Elektrophoresekammern wurden mit Elektrodenpuffer aufgefüllt und 30 min lang eine konstante Stromstärke von 12,5 mA pro Platte angelegt. Mit 35 mA pro Platte wurde dann so lange gefahren, bis die Bromphenolblaufront das untere Plattenende erreicht hatte. Nach dem Lauf wurden die Gele schnell herausgenommen, das Sammelgel abgestreift und in das Coomassie Brilliantblau-Färbebad gegeben.

7.2.14 An- und Entfärben der Polyacrylamidgele:

Kurzzeitfärbung: Die Gele wurden in einer filtrierten Lösung aus 1,25 g Coomassie Brilliantblau in 454 ml 50%igem Methanol und 46 ml Eisessig 20 min lang entfärbt.

Langzeitfärbung: Die Gele wurden in einer 1:10 verdünnten Coomassie Brilliantblaulösung über Nacht angefärbt. Zum Verdünnen wurde ein Gemisch aus 454 ml 50%igem Methanol und 46 ml Eisessig verwendet.

Entfärbt: wurde in ca. 5 - 8 Stunden mit einer Lösung aus 75 ml Eisessig, 50 ml Methanol und 875 ml $H_2O$ dest. Das Bad wurde 4 - 5mal erneuert.

7.2.15 Radioaktivitätsmessungen:

Radioaktivität wurde mit dem Szintillationsspektrometer Betaszint BF 5000 gemessen. Folgende Zählflüssigkeit wurde eingesetzt:

Toluol Szintillator: 4 g PPO = 2,5 Diphenyloxazol und 0,1 g POPOP = 2,2'-p-Phenylen-bis (5-phenyloxazol) in 1 l Toluol.

Unisolve 1: Szintillator der Firma Koch-Light Lab. LTD für die Zählung wäßriger Proben.

Zählausbeutebestimmungen wurden mit Tritium(hydrogen-3) n-hexadecan (Radiochemical Centre Amersham) als interner Standard bestimmt.

Über GF/C Filter (Whatman) gesammeltes radioaktives Protein wurde im Heißluftstrom 20 min lang getrocknet und mit 5 ml Toluol Szintillator gezählt. Zählausbeute für Tritium: 20 %.

Die aus den Plattengelen ausgeschnittenen Gelscheibchen wurden 15 Stunden bei 70° C mit 300 µl 30%igem $H_2O_2$ inkubiert, nach dem Abkühlen mit 3 ml Unisolve 1 versetzt und gezählt. Zählausbeute: 25 %.

7.2.16 Isolierung der poly-A-haltigen mRNA aus Rattenleberpolysomen:

Die zur Isolierung benötigten Glasgeräte wurden bei 170° C über Nacht nucleasefrei gemacht, alle verwendeten Lösungen 1 Stunde bei 120° C und 1 atü Wasserdampf autoklaviert.

3 - 4 g aufgetaute und kleingeschnittene Leber wurde mit 9 ml 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5), 0,25 mM Saccharose, 25 mM HCl, 50 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml Heparin versetzt und mit 1500 Upm gepottert. Nach 5 Hüben gab man 1,2 ml 10% Natriumdesoxycholat, 10 % Triton x-100 dazu und potterte weitere 3 Hübe. Nach der Zentrifugation (5 min, 15 000 rpm, Rotor SS 34) in 15 ml Corex Gläsern wurde der Überstand in 30 ml Corex Gläser überführt, mit 850 µl 1 M $MgCl_2$ versetzt, geschüttelt und 1 Stunde lang bei 4° C gehalten. Über 5 ml einer 1 M Saccharose, 100 mM $MgCl_2$, 200 µg/ml Heparin sammelte man die gefällten Polysomen (10 min, 12 000 rpm, Rotor SS 34) und saugte den Überstand und das Saccharosekissen ab. Innerhalb von 5 min bei 37° C löste man die Polysomen in 6 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5), 1 % SDS, gab 6 ml destilliertes, $H_2O$-gesättigtes Phenol dazu und schüttelte 5 min, gab 6 ml Chloroform dazu und schüttelte weitere 5 min. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (2 min, 10 000 rpm, Rotor SS 34) und die untere Phase entfernt. Es wurden wiederum 6 ml Chloroform dazugegeben, 5 min geschüttelt, zentrifugiert und dieser Vorgang noch zweimal wiederholt.

Zur Alkoholfällung wurde die wäßrige Phase in einem 30 ml Corex Glas abgewogen, mit 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,5) auf 0,1 M gestellt, dann das doppelte Volumen an Äthanol zugemischt und über Nacht bei -20° C gehalten. Die gefällte RNA wurde bei -10°C zentrifugiert (10 min, 10 000 rpm, Rotor SS 34), mit je 5 ml 80%igem und reinem Äthanol bei -10° C gewaschen und anschließend im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

Die RNA löste man mit 1 ml bidest. $H_2O$ unter Schütteln, gab 7 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 M NaCl, 0,1 % SDS dazu, inkubierte für 5 min bei 37° C im Schüttelwasserbad und unterwarf dieses RNA-Gemisch einer Oligo-dT-Affinitäts-Chromatographie. Dazu wurde das Gemisch in einer Pharmaciasäule (0,9 x 15 cm) über ca. 4 ml einer Oligo dT-Zellulose T-2 gegeben (ca. 4 min) und so lange mit dem gleichen Puffer, in dem die RNA gelöst war, gewaschen, bis im UV-Monitor die Grundlinie erreicht war. Poly-A-haltige mRNA wurde mit 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,0) eluiert und auf die gleiche Art und Weise wie oben mit Äthanol bei -20°C über Nacht gefällt. Bevor man die gefällte mRNA mit insgesamt 400 µl bidest. $H_2O$ in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführte, wurde sie mit reinem Äthanol bei -10° C gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 10 000 rpm, Rotor HB-4). Nach erneuter Alkoholfällung wurde die mRNA mit 80%igem und reinem Alkohol je einmal gewaschen, im Wasserstrahlvakuum getrocknet, in 50 - 100 µl bidest. $H_2O$ aufgenommen und bei -80° C abgelagert.

7.2.17 mRNA-Quantifizierung:

Zur Quantifizierung wurde die mRNA mit bidest. $H_2O$ verdünnt, die OD bei 260 nm bestimmt und mit folgendem Faktor umgerechnet:

25 OD = 1 mg/ml.

7.2.18 Darstellung eines $^3H$-markierten 100 000 g Überstandes aus Rattenleber:

Eine 150 g schwere Ratte wurde mit Hydrocortison (200 mg/kg) und Tryptophan (1 g/kg) i.p. behandelt und radioaktives $^3H$-Leucin nach folgendem Schema verabreicht:

| Zeit (min) | Substanz | Verabreichungsform |
|---|---|---|
| 0 | Hydrocortison + Tryptophan | i.p. |
| 30 | 150 µl $^{3}$H-Leucin | i.p. |
| 60 | 150 µl $^{3}$H-Leucin | i.p. |
| 135 | 100 µl $^{3}$H-Leucin | i.v. |
| 220 | 210 µl $^{3}$H-Leucin | i.v. |
| 280 | 250 µl $^{3}$H-Leucin | i.v. |

Das Tier wurde nach 6 Stunden getötet, die Leber entnommen, zerkleinert und mit 25 ml 0,14 M KCl, $10^{-4}$ M DTE und 10 mM L-Tryptophan im Ultra Turrax 30 sec lang homogenisiert. Die Suspension zentrifugierte 60 min lang bei 40 000 rpm im Beckman Rotor Ti 50 und der Überstand wurde bei -20° C aufbewahrt.

7.2.19 Bestimmung des Gesamteinbaus und des löslichen Gesamteinbaus im Weizenkeim- und Retikulozytensystem:

Nach erfolgter Translation wurden den Syntheseansätzen jeweils 5 µl entnommen und auf ein 3 MM-Papierstückchen von 1,5 x 1,5 cm transferiert. Zur Bestimmung des löslichen Gesamteinbaus entnahm man aus dem Überstand nach dem Abzentrifugieren der Polysomen weitere 5 µl. Nach dem Lufttrocknen der Papierstückchen wurden diese bei 0° C in eine 10%ige TCA-Lösung mit 1 % Leucin gegeben und danach 15 min bei 90° C in 5%iger TCA inkubiert. Die Papierstückchen wurden dann weitere 2mal 15 min in 5%ige TCA gegeben, bevor sie durch Behandlung mit Alkohol, Alkohol-Äther 3:1 und Äther von Wasser und TCA befreit wurden. Die mit dem Fön getrockneten Papierscheibchen wurden in Szintillationsgläschen gegeben und mit 3 ml Unisolve 1 gezählt. Die Zählausbeute betrug 20 %. Aus der Menge der eingesetzten Radioaktivität im System und der ermittelten cpm kann auf die Menge des eingebauten Leucins geschlossen werden. Ein Berechnungsbeispiel ist in Tab. 3 gegeben. Einbaubestimmungen im Retikulozytensystem wurden nach PELHAM et al. (29) durchgeführt.

7.2.20 Präzipitation der TAT- und TO-Syntheseprodukte aus dem Weizenkeim- und Retikulozytensystem:

Nach erfolgter Translation wurde dem System 200 µl eines 100 000 g Rattenleberüberstandes zugesetzt. Diesen Überstand gewann man aus einer Ratte, die nach der in 2.1 beschriebenen Methode behandelt wurde. Dadurch wurden die TAT und TO aktiviert. Die Leber wurde nach der in 7.2.18 beschriebenen Methode aufgearbeitet und der Überstand bei -20° C eingefroren. Um später bei Antiserumzugabe eine unspezifische Copräzipitation zu verhindern, wurden vor Zentrifugation 2 ml eines 20 mM Tris-HCl Puffers, 0,14 M NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Natriumdesoxycholat, 1 % L-Leucin, 10 mM L-Tryptophan (pH 7,5) zugegeben. Zentrifugation: Beckman Rotor Ti 50, 50 000 rpm, Polycarbonatröhrchen, 60 min. Nach Abzentrifugation der Polysomen wurde der Überstand geteilt, die eine Hälfte wurde mit 10 µl Anti-TAT-Serum, die andere mit 5 µl Anti-TO-γ-Globulin versetzt. Präzipitation bei 4° C über Nacht. Das Präzipitat wurden über 200 µl 1 M Saccharose, 20 mM Tris-HCl, 0,14 M NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Natriumdesoxycholat (pH 7,5) in Eppendorf-Röhrchen gesammelt (20 min, 10 000 rpm, HB-4 Rotor von Sorvall) und 3mal mit 500 µl des vorher beschriebenen Puffers ohne Saccharose gewaschen. Das Präzipitat wird nach LAEMMLI elektrophoresiert (7,2,13).

7.2.21 Isolierung der Tryptophanoxygenase aus Rattenleber:

Die Tryptophanoxygenase wurde nach der Methode von SCHÜTZ et al. (11) isoliert. Eine zusätzliche Gelfiltration über G-200 ersetzt den dort etablierten präparativen Gelelektrophorese-Schritt.

7.2.22 Autoradiographie und Entwicklung des Röntgenfilms:

Die LAEMMLI-Plattengele wurden nach dem Entfärben 2mal in Dimethylsulfoxyd je 30 min entwässert und danach 3 Stunden in eine Lösung aus 16 g 2,5-Diphenyloxazol und 80 g Dimethylsulfoxyd gelegt. Das Dimethylsulfoxyd wurde danach in Wasser

wieder aus den Gelen entfernt und die Gele über Nacht in einem Pharmacia Geltrockner entwässert. Die trockenen Gele werden im Dunkeln auf einen Röntgenfilm (Kodack RP Royal X-Omat) aufgelegt und bei -80° C 2 - 8 Tage belichtet.
Entwicklung: 5' bei 20 - 25° C mit (Röntgen-Entwickler G-150), kurz zwischenwässern und 20 min fixieren (Röntgenschnellfixierer G-334).

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Synthese der Tyrosinaminotransferase und der Tryptophanoxygenase im Weizenkeim- und Retikulozytensystem. Mit Hilfe dieser Translationssysteme wurde der TAT- und TO-mRNA-Gehalt nach Substratinduktion in der Rattenleber bestimmt.

Zunächst wurde nach einer geeigneten Reinigungsmethode für die TAT gesucht, da für die Herstellung eines Anti-TAT-Serums größere Mengen reinen Enzyms benötigt wurden. In einer Dreistufenreinigung wurde die TAT dargestellt. Mit Hilfe eines Affinitätsgels konnte die TAT direkt aus einem 100 000 g Überstand 260fach angereichert werden. Dabei wurde das Affinitätsgel aus dem Coenzym der TAT und einer Sepharosematrix synthetisiert. Nach einer CM-50-Kationenaustauscher-Chromatographie und einer G-200-Gelfiltration zeigte das Enzym in einem SDS-Polyacrylamidgel eine einheitliche Proteinbande. Das Molekulargewicht der TAT-Untereinheit wurde mit 50 000 Daltons ermittelt. Die drei im Kationanaustauscher auftretenden multiplen Formen der TAT ergaben hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität keine Unterschiede.

Das aus dieser Enzympräparation gewonnene Antiserum war spezifisch und inaktiverte die TAT hinsichtlich ihrer Aktivität.

Ein zellfreies, aus Weizenkeimen gewonnenes Proteinbiosynthesesystem synthetisierte mit einer poly-A-haltigen Gesamt-mRNA-Präparation TAT und TO, nachdem das System hinsichtlich seiner Polyamin-, Magnesium-, Kalium- und Aminosäurekonzentration für eine Synthese der beiden Enzyme optimiert war. Das mit dem

Anti-TAT-Serum präzipitierte Produkt zeigte nach dem Lauf im SDS-Polyacrylamidgel ein höheres Molekulargewicht als das in vivo aus der Rattenleber präzipitierte. Um abzuklären, inwieweit dieses ein weizenkeimspezifisches Phänomen ist, wurde ein Retikulozytensystem etabliert und mit poly-A-haltiger Gesamt-RNA aus Rattenleber beide Enzyme synthetisiert. Dieses glückte jedoch erst nach Zerstörung der internen mRNA mit einer calziumabhängigen Nuclease. Auch hier zeigte das TAT-Syntheseprodukt die gleiche höhermolekulare Form. Es galt nun abzuklären, inwieweit dieses höhermolekulare Protein hinsichtlich seiner Sequenz mit dem in vivo gefundenen Protein identisch ist. Die folgenden Versuchsergebnisse sprechen für eine Identität der in vitro und in vivo gefundenen Untereinheiten.

a) Präzipitation und Identifikation des in vitro TAT-Syntheseprodukts mittels eines Anti-TAT-Antikörpers, der von einer anderen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, ergibt das gleiche Bild hinsichtlich der Position im SDS-Gel. Wichtig ist dabei, daß die Antikörperherstellung mit einer anderen TAT-Enzympräparation erfolgte. Diese Tyrosinaminotransferase wurde mit einer anderen Reinigungsmethode isoliert.

b) Ein Peptidmapping mit Cyanbromid ergibt bei den in vivo und in vitro gewonnenen radioaktiven TAT-Untereinheiten das gleiche Peptidmuster.

c) Die mRNA, die für die in vivo gefundene Bande codiert, ist durch Hydrocortison stimulierbar.

Das eine höhermolekulare Vorstufe der TAT in der Leber besteht,

ist unwahrscheinlich. Versuche eines Processings der in vitro synthetisierten höhermolekularen Form mit Hilfe eines Leberhomogenats ergaben keine eindeutige Aussage. Auch eine Dephosphorylierung der "in vivo"-TAT ergibt, wie zu erwarten, keine Positionsänderung im SDS-Gel.

Bei den Untersuchungen über die TAT- und TO-mRNA-Konzentration nach Substratinduktion in der Rattenleber erhielt man folgende Aussagen:

a) Hydrocortison stimuliert die TAT und TO unter Erhöhung der TAT und TO-mRNA-Konzentration.

b) Tryptophan induziert die TO im adrenalektomierten Tier wie auch mit Hydrocortison zusammen. Dabei ist keinerlei TO-mRNA-Steigerung festzustellen. Diese Induktion beruht offensichtlich nur auf einer Aktivitätsaktivierung mit Phosphyrin und einer Enzymstabilisierung (39).
Die TAT-Aktivität wird durch das Tryptophan allein sowie in Verbindung mit Hydrocortison stimuliert. Dabei erhöht sich die TAT-mRNA additiv, ob die Erhöhung auf eine Hemmung des RNA-Abbaus oder auf eine Transkriptionsstimulierung zurückzuführen ist, blieb ungeklärt.

c) Tyrosin hat keinerlei Wirkung auf die TO-Induktion, stimuliert aber die TAT in Verbindung mit Hydrocortison. Interessant ist hierbei der Befund, daß die TAT-mRNA-Konzentration um ein Vielfaches höher ist als die Konzentration bei Hydrocortisoninduktion alleine. Tyrosin allein hat im adrenalektomierten Tier keinerlei Einfluß auf die TAT-Aktivität und TAT-mRNA-Konzentration. Diese Wirkung ist also synergistisch.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS


1) LIN, E.C.C., KNOX, W.E., J. Biol. Chem. 233, 1186 - 1189 (1958)

2) CIVEN, M., KNOX, W.E., J. Biol. Chem. 234, 1787 - 1790 (1959)

3) SCHÜTZ, G., BEATO, M., FEIGELSON, P., Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1218 - 1221 (1973)

4) ROWEKAMP, W.G., HOFER, E., SEKERIS, C.E., Eur. J. Biochem. 70, 259 - 268 (1976)

5) WICKS, W.D., KENNEY, F.T., LEE, K.L., J. Biol. Chem. 244, 6008 - 6013 (1969)

6) ERNEST, M.J., FEIGELSON, P., J. Biol. Chem. 253, 319 - 322 (1978).

7) ROPER, M.D., WICKS, W.D., Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 140 - 144 (1978)

8) SEKERIS, C.E., NIESSING, J., SEIFART, K.H., FEBS Letters 9, 103 - 104 (1970)

9) NOGUCHI, T., DIESTERHAFT, M., GRANNER, D., J. Biol. Chem. 253, 1332 - 1335 (1978)

10) KENNEY, F.T., FLORA, R.M., J. Biol. Chem. 236, 2699 - 2702 (1961)

11) SCHÜTZ, G., FEIGELSON, P., J. Biol. Chem. 247, 5327 - 5332 (1972)

12) BELARBI, A., BOLLACK, C., BECK, J.P., BECK, G., FEBS Letters 75, 221 - 225 (1977)

13) ROEWEKAMP, W., SEKERIS, C.E., FEBS Letters 73, 225 - 228 (1977)

14) STILES, C.D., LEE, K.L., KENNEY, F.T., Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2634 - 2638 (1976)

15) HOFER, E., SEKERIS, C.E., Eur. J. Biochem. 86, 547 - 554 (1978)

16) MILLER, J.V., CUATRECASAS, P., THOMPSON, B., Biochim. Biophys. Acta 276, 407 - 415 (1972)

17) JOHNSON, R.W., ROBERSON, L.E., KENNEY, F.T., J. Biol.. Chem. 248, 4521 - 4527 (1973)

18) AVIRAM, M., HERSCHKO, A., Biochim. Biophys. Acta 498, (1977)

19) REISFELD, R.A., SMALL, P.A., Science 152, 1253 - 1255 (1966)

20) WEBER, K., OSBORN, M., J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412 (1969)

21) ROBERTS, B.E., PATERSON, B.M., Proc. Natl. Acad. Sci. 70 (1973)

22) HOLT, P.G., OLIVER, T., FEBS Letters 5, 89 - 91 (1969)

23) RODRIGUEZ, J.M., PITOT, H.C., Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 510 - 518 (1975)

24) JAMES, G.T., Anal. Biochem. 86, 574 - 579 (1978)

25) LÆE, K.L., NICKOL. J.M., J. Biol. Chem. 249, 6024 - 6026 (1974)

26) AURICCHIO, F., VALERIOTE, F., TOMKINS, G., Biochim. Biophys. Acta 221, 307 - 313 (1970)

27) LITWACK, G., LICHTASH, E., Nature 237, 149 - 150 (1972)

28) ATKINS, J.F., LEWIS, J.B., ANDERSON, C.W., GESTELAND, R.F., J. Biol. Chem. 250, 5688 - 5695 (1975)

29) PELHAM, H.R.B., JACKSON, R.J., Eur. J. Biochem. 67, 247 - 265 (1976)

30) DIESTERHAFT, M., NOGUCHI, T., HARGROVE, J. THORNTON, C., GRANNER, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 1015 - 1022 (1977)

31) persönliche Mitteilung von Dr. W. ROEWEKAMP

32) VALERIOTE, F.A., AURICCHIO, F., TOMKINS, G.M., RILEY, D., J. Biol. Chem. 244, 3618 - 3624 (1969)

33) LAEMMLI, U.K., Nature 227, 680 - 685 (1970)

34) HUISMAN, J.G., MOORMANN, A.F.M., VERKLEY, F.N., Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 1121 - 1131 (1978)

35) ROSEN, F., MILHOLLAND, R.J., J. Biol. Chem. 238, 3730 - 3735 (1963)

36) International Union of Pure and Applied Physics, Rep. 7$^{th}$ Gen. Ass. I. U. P. A. P. Kopenhagen (1951)

37) KRÖGER, H., GREUER, B., Nature 210, 200 - 201 (1966)

38) TOMKINS, G.M., GELEHRTER, T.D., GRANNER, D., MARTIN, D.jr. SAMUEL, H.H., THOMPSON, E.B., Science 166, 1474 (1969)

39) GREENGARD, O., FEIGELSON, P., J. Biol. Chem. 236, 158 - 161 (1961)

40) KRÖGER, H., KOTULLA, W., HOSHINO, J., Z. Naturforsch. 246, 229 - 233 (1969)

41) STELOS, P., In: Handbook of Experimental Immunology edited by D.U. WEIR, Blackwall, 1967.

42) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

43) WAGNER, H., Arzneimittelforschung 24, 330 - 333 (1974)

44) GRANNER, D.K., TOMKINS, G.M., In: Methods in Enzymology, 633 - 637, Vol. XVII, Part A

45) HAYASHI, S., GRANNER, D.K., TOMKINS, G.M., J. Biol. Chem. 242, 3998 - 4006 (1967)

46) EVANS, M.J., LINGREL, J. B., Biochemistry 8, 829 - 831 (1969).

# L e b e n s l a u f

Am 4. 4. 1948 wurde ich, Peter Donner, als Sohn des im Frühjahr 1978 verstorbenen Färbereitechnikers Alfred Donner und seiner Ehefrau Gerda Donner, geb. Eichler, in Mylau geboren.

In Lörrach besuchte ich die Volksschule und in Rheinfelden die Realschule, die ich 1965 mit der Mittleren Reife abschloß. Meine Chemielaborantenlehre bei der Firma Ciba-Geigy AG in Grenzach beendete ich 1968 mit der Gesellenprüfung. Danach besuchte ich die Technische Fachhochschule Berlin. Dieses Studium schloß ich 1971 mit der Prüfung zum Ingenieur grad. (Techn. Chemie) ab. Danach studierte ich Biochemie an der Freien Universität Berlin und legte dort 1975 meine Diplomprüfung ab. Meine Diplomarbeit erstellte ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. D. Wachsmuth im Friedrich Miescher Institut in Basel über Substratanaloga für die membrangebundene Aminopeptidase M. Im Sommer 1975 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Professor Dr. Dr. H. Kröger am Robert Koch-Institut.

Bönecke-Druck 3392-Clausthal-Z. 29